



Adaptations de la cascade de signalisation AMPc/PKA dans le striatum au cours de la maladie de Parkinson et de son traitement par la L-DOPA : étude par imagerie de biosenseurs sur un modèle animal

Cédric Yapo

► To cite this version:

Cédric Yapo. Adaptations de la cascade de signalisation AMPc/PKA dans le striatum au cours de la maladie de Parkinson et de son traitement par la L-DOPA : étude par imagerie de biosenseurs sur un modèle animal. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS603 . tel-02901403

HAL Id: tel-02901403

<https://theses.hal.science/tel-02901403>

Submitted on 17 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
(SORBONNE UNIVERSITÉ)

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Présentée et soutenue publiquement le 8 Novembre 2018

par

Cédric Yapo

Institut de Biologie Paris-Seine, UMR 8256 CNRS *Biological Adaptation and Ageing*
équipe *Intégration Cellulaire des Signaux Neuromodulateurs*

École doctorale Cerveau-Cognition-Comportement (ED158)
Spécialité **Neurosciences**

**Adaptations de la cascade de signalisation AMPc/PKA dans le striatum au cours de la
maladie de Parkinson et de son traitement par la L-DOPA : étude par imagerie de
biosenseurs sur un modèle animal**

Devant un jury constitué de :

M. Laurent Venance, DR, Collège de France
Mme Julie Perroy, DR, IGF Montpellier
M. Grégoire Vandecasteele, DR, UPSud
Mme Régine Hepp, MCU, Sorbonne Université
Mme Virginie Beray-Berthet, MCU, Paris Descartes
Mme Florence Noble, DR, Paris Descartes
Mme Liliana Castro, MCU, Sorbonne Université
M. Pierre Vincent, DR, Sorbonne Université

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

Mon travail de thèse (quatre belles années d'aventure dans l'univers de la neuropharmacologie, l'écriture du présent manuscrit ainsi que la soutenance du jeudi 8/11/18) n'aurait pas été possible sans la précieuse contribution de tous les êtres qui ont éveillé/stimulé en moi l'envie de m'accomplir dans le domaine des sciences et de la santé; le goût d'apprendre, de prospecter, expérimenter, persévérer... Et que je tiens à remercier très cordialement.

Tout d'abord remerciements à mon équipe.

À mes directeurs de thèse, les docteurs Pierre Vincent et Liliana Castro. Presque cinq années passées à vos côtés, au cours desquelles j'ai pu apprendre et me former, profitant de vos lumières, encouragements, de votre sympathie, disponibilité, et de votre confiance. Grand merci pour cette aventure. À Élia et Julie, pour tous les bons moments que nous avons partagés, pour votre esprit, votre joie, et vos sourires. Pour votre aide inestimable dans la préparation de la soutenance. Du courage pour votre dernière ligne droite ! Aux anciens de l'équipe : le Dr. Danièle Tritsch, Lorna, Dahdjim, Aurélie, Jérôme, Bryon, Anissa, Manon, et Ilyes. Aux collaborateurs qui ont séjourné de façon transitoire dans l'équipe : Anu, Ronit, le Dr. Oliver Griesbeck, Arne, le Dr. Juan Llopis, Giuseppe, le Dr. Riquet. Aux collègues de l'équipe Limon : les Drs. Isabelle Limon, Martine Glorian et Régis Blaise, Benjamin, Justine, Yohan et Mégane. Aux personnels externes à l'équipe et qui ont toujours contribué à son bon fonctionnement : le Dr. Friguier, Johanne, Philippe, Caroline, Florence, Aurélie, Marie-Jo, Bernadette, Marie-France, Mariatou, Maryse, les personnels du service de reprographie et d'impression des posters, les animaliers de l'A8 et du B8, les responsables de l'espace A2L2 (I Dusart, Coralie, Vincent Kappes), France Lam de la plateforme d'imagerie du B7.

Je remercie aussi sincèrement tous les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'apporter leur expertise à l'évaluation de mon travail, pour tous leurs conseils avisés, leurs remarques, mais aussi pour leur présence chaleureuse et enthousiaste le jeudi 8. Merci au Dr. Laurent Venance, qui a également participé à mes comités de suivi de thèse (along with Dr. Susanna Waters, many thanks), à mes rapporteurs les Drs. Julie Perroy et Grégoire

Vandecasteele, qui ont généreusement accepté de reviewer mon manuscrit et aidé à le perfectionner, au Dr. Régine Hepp, pour sa disponibilité, mais aussi pour sa joie et sa sympathie, véritable bol d'air au sein du bâtiment, au Dr. Virginie Beray- Berthet, qui a suscité mon intérêt pour la pharmacologie et la recherche durant mes années Pharmacie (M1 PPT/spécialisation industrie/stage d'application à MTL...), et enfin au Dr. Florence Noble, pour son travail important et passionnant sur les addictions.

Mes remerciements aussi à toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu échanger durant le doctorat : les Drs. Xavier Nicol, mon tuteur à l'ED3C, et Nicolas Gervasi, pour leur présence et encouragements lors des rencontres scientifiques de l'ED3C, à l'ED3C, son directeur Alain Trembleau et son staff (notamment Christelle Arruebo) pour le programme de formation, l'organisation des rencontres scientifiques, l'événement Roscoff 2017, tous les camarades de l'ED3C, à qui je souhaite un futur radieux (mention spéciale à Déborah, Cynthia, Fera et Béné). À tous les membres des équipes des Drs. Trembleau/Caillé (Maxime en particulier), Bruggs/Jacotot/Périn (Benjamin en particulier), Néri, Hepp/Tricoire, Leresche/Lambert, Faure (Romain, Jérémie), Van Houtte/Caboche, collègues et personnels de l'IBPS qui me liront ;), à l'équipe Girault de l'IFM (notamment Sophie pour mes premières manips d'immunohisto), aux rencontres de Copenhague (FENS 2016)/Bordeaux (Neurofrance 2017)/Toulouse (Meeting Biosenseurs 2017), aux membres des clubs AMPc et biosenseurs. Merci aux deux organismes qui ont financé ma thèse : le DIM Cerveau et Pensée IdF 2014 et l'association France Parkinson. En particulier merci au Dr. Marie Fuzatti et aux patients de l'asso rencontrés à l'occasion de la journée mondiale 2018.

Merci sincère à tous mes anciens boss et collègues des pharmacies Pereire-Massuelle et Europe, de la faculté de Pharmacie Paris Descartes (les Drs. Schermann et Fanchon Bourasset, Minh Do, Hélène et Béatrice), de l'université de Montréal (les Drs. Anna Samaha, Elli-Anna, Cynthia El Hage, Florence, Amine, Alice), à Hugo, Ivo, Marie-Vi, David, Sammy, René et Hibou. Merci aux camarades de Pharma, depuis la P1 jusqu'à la 5AHU (mention spéciale au groupe 16, à Pascal, Chao, Hélène, Cécilia, Nicolas, Michael, Anna, PAX, P-Max, Léonore, Rockson, Chris, Abbas...), à tous mes profs de Pharma (en particulier aux profs de physio/pharmaco/sciences végétales...), aux Drs. Vidal et Bénazeth, à mes camarades de filière indus - spé pharmaco, au groupe Erythropoïétine, à Olivier,

Laure-Anne, Stéphanie, Alexandre, Orianne, Sorelle... Merci aux Drs. Metlaine et Léger du Centre du Sommeil de l'Hotel Dieu, aux collègues de l'UMED, au Dr. Goshne, aux docteurs en pharmacie avec qui j'ai réalisé mon externat à l'Hotel Dieu et à tous les patients que j'y ai rencontré.

Remerciements à Chantal, Mme Debon, Patrick, M. Ortuno, Mathilde et sa guitare, M. Dubois, Maxime et maman Rollande, Charles, François, Annabelle, Roxanne, Raphael et Romain, Guillaume, Adrien et famille, Sacha et Sacha, Imane, Souabérata, Mamadou, Teddy... À mes amis les plus proches : Alex, Peter, Anna, les meilleurs, à la team Condor : Jé G, Auré K, Ju L, Milé N, Baptiste D, Stéphane L, Céline, Alizée, Marguerite, Aude P, Lolotte, Adri...

Et enfin, last but not least, énormes remerciements à ma famille : à ma maman, que j'aime énormément, à mon père, que j'aime éternellement, à mes fratté : Pierro et Océ. Aux cousins/cousines, oncles et tantes, en particulier Mathieu, Simone, Jeanne, Mariétou, Papis, Alain, Sébastien, Cathy, Willy... Et au reste de la tribu, où qu'elle soit, dans Paris/Alépé/Montézo/US... Beya.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	4
Abréviations	6
Résumé	8
Abstract	10
Introduction	12
I. L'organisation des ganglions de la base : origines du contrôle moteur	12
1. Le circuit des ganglions de la base	12
2. Le striatum	16
3. Les différents neurones du striatum	18
4. Distinction biochimique entre les MSNs de type D1 et D2	20
5. Connectivité des MSNs	21
II. Biologie de la neuromodulation dopaminergique dans le striatum	24
1. Métabolisme de la dopamine dans les neurones du mésencéphale	24
2. La voie dopaminergique nigro-striée	28
3. Contrôle dichotomique des voies directe et indirecte par la dopamine	31
III. Transduction du signal dopaminergique dans le striatum	34
1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)	34
2. Les Adénylyl cyclases (ACs)	35
3. Les Phosphodiesterases (PDEs)	37
4. La Protéine kinase AMPc-dépendante (PKA)	50
5. Les autres effecteurs de l'AMPc	51
6. Les Phosphatases	53
7. DARPP-32 : 3ème messenger spécifique du striatum	55
8. Les récepteurs D1- et D2-like dopaminergiques	56
Objectifs	64
Matériel et méthodes	66
Animaux	66
Biosenseurs FRET	66
Infection virale	67
Souris 6-OHDA : modèle de la maladie de Parkinson	67
Stimulation pharmacologique des récepteurs	68

Modélisation in silico	69
Résultats	72
Article 1 : Détection des signaux dopaminergiques phasiques par les neurones épineux striataux de types D1 et D2	72
Article 2 : Des réponses PKA de type “tout ou rien” dans le noyau des neurones épineux striataux	74
Article 3 (en préparation) : Activité accrue des phosphodiesterases de type 2 et 4 dans le striatum des souris lésées à la 6-OHDA : vers l’identification de nouvelles cibles ou biomarqueurs pour le traitement de la maladie de Parkinson ?	76
Résumé	76
Introduction	76
(Figures) Increased PDE2/4 activities in the striatal spiny neurons of the 6-OHDA-lesioned mouse model of Parkinson’s disease (en préparation)	78
Description rapide des résultats	79
Discussion	86
Conclusion générale et perspectives	98
Bibliographie	100
Annexes	136
Revue : Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones	136

Abréviations

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

AC : adénylyl cyclase

AKAP : *A Kinase anchoring protein*

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

CREB : cAMP-responsive element binding protein

DA : dopamine

DLS : striatum dorsolatéral

DMS : striatum dorsomédian

EPAC : protéine d'échange directement activée par l'AMPc

ERK : *extracellular signal-regulated kinase*

FRET : "Förster resonance energy transfer"

fsk : forskoline

GABA : acide gamma amino butyrique

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPe : globus pallidus externe

GPi : globus pallidus interne

GSK3b : Glycogène-synthase kinase 3b

IBMX : isobutylmethylxanthine

Kir : *inwardly rectifying potassium channel*

L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine

LTD : long term depression

LTP : long term potentiation

MSNs : *medium-sized spiny neurons*

NAc : noyau accumbens

NOS : *Nitric oxyde synthase*

PDE : phosphodiesterase

PFC : cortex préfrontal

PI3K : phosphatidyne 3 kinase

PKA : protéine kinase AMPc-dépendante

PP : protéine phosphatase

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

SNpc : substance noire *pars compacta*

SNr : substance noire *pars reticulata*

STN : noyau subthalamique

TH : tyrosine hydroxylase

Résumé

Les signaux neuromodulateurs induisent une adaptation des fonctions neuronales par le biais de mécanismes d'intégration dynamiques complexes. Parmi les voies de signalisation intracellulaires, celle de l'AMPC/PKA joue un rôle essentiel dans la réponse cellulaire à la dopamine. Pour analyser ces processus d'intégration, nous combinons l'imagerie de biosenseurs dans des préparations *ex vivo* de tranches de cerveau de souris avec de la modélisation de la signalisation intracellulaire dans les neurones D1 et D2 striataux.

Dans une première partie de mon travail de thèse, nous analysons la dynamique de la signalisation striatale en réponse à des stimulations dopaminergiques transitoires telles celles associées aux récompenses. Nous montrons par imagerie que, contrairement à ce qui est communément admis, les récepteurs D₂ à la dopamine permettent la détection de dopamine phasique au niveau de l'AMPC. De plus, les simulations suggèrent que les neurones D2 pourraient détecter une diminution du niveau de dopamine tonique, indicateur d'une situation aversive chez l'animal. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Yapo et al., *J. Physiol* 2017).

Dans une deuxième partie, nous avons analysé l'effet dans le noyau de ces stimulations dopaminergiques rapides. En comparaison avec les neurones du cortex, nous montrons que les neurones du striatum disposent d'un mécanisme de contrôle en-avant ("*feed forward*") qui renforce les réponses PKA nucléaires. Cette situation originale, à l'opposé des rétrocontrôles homéostatiques habituels en biologie, amène à une réponse du noyau tout ou rien, extrêmement sensible. Nous pensons que ce mécanisme est impliqué dans la détection des signaux dopaminergiques transitoires. Ce travail a été publié dans un article (Yapo et al., *J Cell Science* 2018).

Enfin une troisième partie, sous forme de résultats préliminaires, consistait à analyser l'adaptation des neurones du striatum à la perte des afférences dopaminergiques, caractéristique de la maladie de Parkinson. Nous avons observé l'hypersensibilité à la dopamine affectant les neurones D1, largement décrite dans la littérature. De plus, nous montrons que les neurones du striatum présentent une activité phosphodiesterase accrue. Une meilleure compréhension de ces adaptations pathologiques pourrait mener à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Abstract

Neuromodulatory signals trigger adaptations in neuronal functions via complex integrative properties. Among the various existing intracellular signaling pathways, the cAMP/PKA cascade plays a critical role in the cellular response to dopamine. To analyze these integrative processes, we combine biosensor imaging in mouse brain slices with *in silico* modelisation of the intracellular signaling in D1 and D2 medium-sized spiny neurons.

In a first part of my thesis work, we analyze the dynamics of cAMP/PKA signaling in striatal neurons stimulated by transient dopaminergic signals, such as those associated with reward. With imaging we show that the dopamine D₂ receptors can sense phasic dopamine signals at the level of cAMP, a thought that has been argued for long. Moreover *in silico* simulations suggest that D2 spiny neurons could sense the interruptions in tonic dopamine levels associated with aversion in the animal. This work was published in ([Yapo et al., *J Physiol* 2017](#)).

In a second part, we analyzed the effect of such brief dopaminergic signals on the nuclear PKA-dependent signaling. In comparison to cortical neurons, we show that the striatal neurons display a positive feedforward mechanism which strengthens the nuclear responses. This peculiar situation, which contrasts with the usual homeostatic feedback mechanisms found in biology, leads to all-or-nothing and extremely sensitive responses. We believe that this mechanism allows for the detection of transient dopaminergic signals. This work was published in ([Yapo et al., *J Cell Science* 2018](#))

Lastly a third part, that will be introduced as preliminary data, consisted in analyzing the adaptations of the striatal neurons following a dopamine depletion, such as the one found in Parkinson's disease. We observed in our mouse model an hypersensitivity of the D1 spiny neurons to dopamine, already described by other groups. Additionally we show that striatal neurons display an increased phosphodiesterase activity. A better understanding of these pathological adaptations could lead to the emergence of new therapeutic strategies.

Introduction

I. L'organisation des ganglions de la base : origines du contrôle moteur

Le circuit des ganglions de la base désigne un ensemble de structures cérébrales très conservées dans l'évolution des vertébrés, et dont le rôle a été démontré important pour l'exécution de processus multiples, en lien avec des fonctions affectives, cognitives, et motrices (Graybiel, 2008; Redgrave et al., 2010; Nelson et Kreitzer, 2014; Surmeier et al., 2014).

1. Le circuit des ganglions de la base

Les ganglions de la base, ou noyaux gris centraux, sont un collectif de noyaux sous-corticaux interconnectés, et qui communiquent avec d'autres régions du cerveau comme le cortex cérébral, le thalamus et les noyaux du tronc cérébral, pour réguler des fonctions comme l'apprentissage moteur, l'habituatation, ou encore la sélection des actions (Bolam et al., 2000; Graybiel, 2008; Redgrave et al., 2010; Nelson et Kreitzer, 2014; Surmeier et al., 2014). La plupart des régions du cortex cérébral projettent vers les ganglions de la base, dirigeant leurs projections excitatrices vers les noyaux dits d'entrée (voir striatum). Les noyaux d'entrée des ganglions de la base traitent alors l'information nerveuse afférente (*processing*), la transmettent à des noyaux dits de sortie, et ces derniers relaient l'information traitée à d'autres systèmes et circuits neuronaux impliqués dans la production des réponses comportementales (Obeso et Lanciego, 2011; Nelson et Kreitzer, 2014).

Les principaux constituants du circuit des ganglions de la base sont : le néocortex, le striatum (noyau caudé et putamen chez le primate, séparés par la capsule interne, et noyau accumbens), les segments interne et externe du globus pallidus (respectivement GPi et GPe, deux segments adjacents chez le primate, mais séparés chez le rongeur), le noyau sous-thalamique (*subthalamic nucleus*, STN), et la substance noire (segments *pars compacta* et *pars reticulata*, SNc et SNr respectivement). Le modèle prédominant de l'organisation

anatomo-fonctionnelle entre ces noyaux (le *rate model*) est établi à la fin des années 1980s (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Nelson et Kreiter, 2014), et a depuis été raffiné grâce au développement de nouvelles techniques telles que le traçage de voie ou les nouvelles approches génétiques (e.g. optogénétique ou souris BAC, *Bacterial artificial chromosome*). Chaque structure des ganglions de la base joue un rôle important et plus ou moins spécifique dans les processus de production motrice (initiation, automatisme, terminaison), ce en intégrant des informations variées, à la fois motrices et non-motrices (Shi et al., 2004).

Les deux grandes voies anatomiques du circuit des ganglions de la base (directe et indirecte) :

Le striatum est le principal noyau d'entrée des ganglions de la base. Il reçoit des afférences excitatrices (signaux glutamatergiques) de pratiquement toutes les régions corticales, impliquées dans les processus sensorimoteurs, cognitifs et affectifs (Redgrave et al., 2010). Il reçoit aussi de nombreuses afférences en provenance du thalamus (noyaux intralaminaires, noyaux des complexes centromédian et parafasciculaire, noyaux médiodorsaux et ventrolatéraux) (Smith et al., 2004), et des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Smith et Kieval, 2000).

Les neurones épineux moyens, ou *medium-sized spiny neurons* (MSNs) en anglais, sont la principale cible des afférences cortico-striatales, constituent 95% de sa population neuronale (Kemp et Powell, 1971), et sont ses seuls neurones de projection (Grofova, 1975). Ils sont GABAergiques et traditionnellement divisés en deux groupes, suivant leurs sites de projection : le groupe des MSNs striato-nigraux, qui projettent directement vers les noyaux de sortie (GPi et SNr, qui contiennent tous deux des neurones GABAergiques) et constituent la “voie directe” du circuit des ganglions de la base; et le groupe des MSNs striato-pallidaux, qui projettent vers le GPe, et de façon polysynaptique vers les noyaux de sortie (GPi et SNr, via le STN), et constituent la “voie indirecte” (Figure 1).

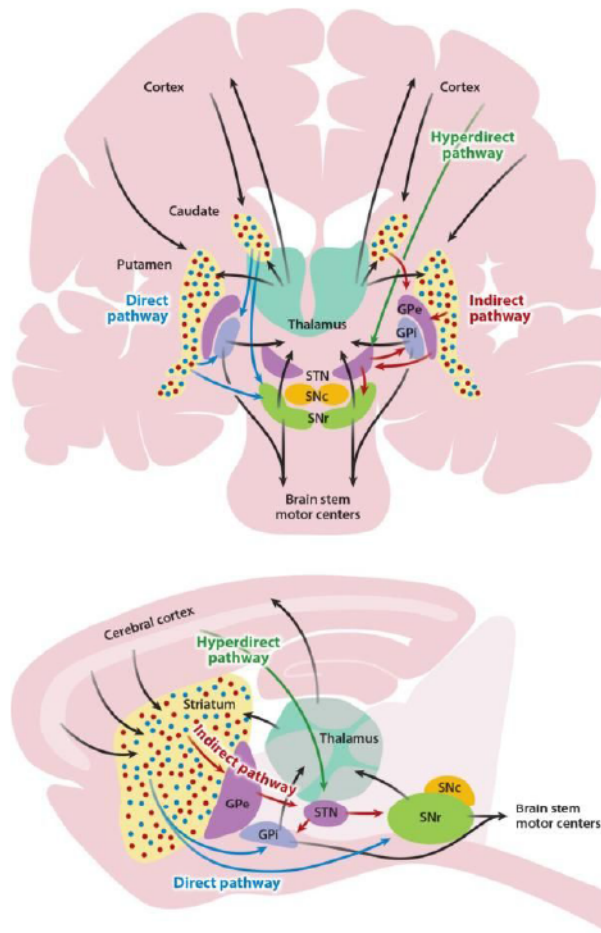


Figure 1 : Organisation des ganglions de la base suivant le modèle classique

Le striatum contient majoritairement des neurones de projection GABAergiques, les MSNs, répartis dans deux groupes : la moitié projette directement vers les noyaux de sortie (GPI et SNr) et sont à l'origine de la voie directe; l'autre moitié projette vers le GPe, puis vers les noyaux de sortie par l'intermédiaire du STN (voie indirecte). Le STN reçoit des afférences du cortex (centres moteurs primaires, supplémentaires, prémoteurs) et du GPe via la voie indirecte. Il est composé essentiellement de neurones glutamatergiques, et envoie des stimuli excitateurs aux noyaux de sortie. Une voie dite hyperdirecte engageant la boucle cortex/STN/noyaux de sortie, est également impliquée dans la suppression des actions. Le GPe est un noyau dit intrinsèque, qui reçoit des afférences GABAergiques en provenance des MSNs de la voie indirecte, ainsi que des afférences excitatrices en provenance des neurones du STN (pacemaker intrinsèque). Le GPe contient des neurones GABAergiques qui projettent vers pratiquement tous les autres ganglions de la base. Les noyaux de sortie, le GPI d'une part (noyau entopédonculaire chez le rongeur), et la SNr d'autre part sont aussi composés de neurones GABAergiques, dont l'activité tonique est élevée. L'activité des noyaux de sortie inhibe les centres moteurs du thalamus et du tronc cérébral. Le GPI reçoit des afférences inhibitrices en provenance du striatum (voie directe), des afférences excitatrices en provenance du STN, du thalamus et inhibiteurs en provenance du GPe, et projette vers le thalamus et les centres moteurs du tronc cérébral (d'après Nelson et Kreitzer, 2014). STN: noyau subthalamique, SNr: substance noire *pars reticulata*, GPI: globus pallidus interne, GPe: globus pallidus externe

Ce sont essentiellement les entrées cortico-striatales (essentiellement de la couche V du néocortex) et cortico-thalamiques qui permettent l'activation des voies directe et indirecte du circuit des ganglions de la base (Wickens, 2009). Selon les prédictions du modèle classique, ces deux voies convergent à l'opposé pour influencer l'activité des noyaux de sortie (GPi et SNr), qui à leur tour régulent nos réponses comportementales via les circuits thalamocorticaux et les centres moteurs du tronc cérébral (Grillner et al., 2005; Nelson et Kreitzer, 2014; Sippy et al., 2015). Au repos, les deux noyaux de sortie exercent une inhibition tonique sur le thalamus (Chevalier et Deniau, 1990). La voie directe, en inhibant l'activité des noyaux de sortie, permet de désinhiber les circuits thalamocorticaux et du tronc, et favorise la production du mouvement (d'où l'appellation de voie "Go"). A l'opposé la voie indirecte en augmentant l'activité de la SNr, via excitation par le STN, renforce l'inhibition des circuits moteurs et supprime ainsi le mouvement (voie "No Go") (Chevalier et Deniau, 1990; Freeze et al., 2013; Kravitz et Kreitzer, 2012). La dopamine régule de façon miroir l'activité de ces deux voies (voir chapitre signalisation récepteurs)(Calabresi et al., 2007; Shen et al., 2008; Surmeier et al., 2007). Enfin, une troisième voie de contrôle du mouvement est décrite dans l'organisation des ganglions de la base : c'est la voie hyperdirecte, qui relie le cortex moteur au noyau STN, et dont l'activation permet l'arrêt de certains programmes moteurs en cours au profit d'autres programmes sélectionnés (Nambu et al., 2002; Nelson et Kreitzer, 2014).

Pendant des années, les éléments clés du modèle classique des ganglions de la base et la vision du Go/No Go (rôles antagonistes des voies directe et indirecte sur le contrôle moteur) ont été confortés par des études sur la fonction et la dysfonction des ganglions de la base (Nelson et Kreitzer, 2014; Calabresi et al., 2014). Cependant, de récentes études questionne la robustesse de ce modèle, et font la preuve que les deux voies coopèrent pour l'exécution de certaines tâches (Nambu, 2008). En particulier les travaux de Cui et collègues, qui en utilisant des indicateurs calciques montrent que les voies directe et indirecte peuvent être actives de façon concomitante lors de l'initiation des mouvements (Cui et al., 2013).

2. Le striatum

En 1664 l'anglais Thomas Willis décrivait pour la première fois l'anatomie du *corpus striatum*, pour lequel il soupçonnait un rôle important dans de nombreuses fonctions sensorielles et motrices. Au début du 20ème siècle, plusieurs études de physiopathologie confirment son intuition en montrant que des lésions affectant cette structure cérébrale provoquent des troubles moteurs. Aujourd'hui, on sait le striatum impliqué dans l'émergence d'un grand nombre de pathologies, notamment la schizophrénie, les maladies de Parkinson et de Huntington, la dystonie, les troubles obsessionnels compulsifs (TOCs), le syndrome de Tourette, et les addictions (Graybiel, 2008; Hyman et al., 2006).

Subdivisions et compartiments du striatum :

1 - Divisions du striatum :

Le striatum est traditionnellement divisé en deux parties, une dorsale et une ventrale (qui comprend le noyau accumbens) mais qui ne présentent pas de vraie différence du point de vue cytoarchitectural (Voorn et al., 2004; Kreitzer, 2009)(Figure 2e). La division est surtout basée sur les différences d'afférences corticales, thalamiques et dopaminergiques qui innervent ces parties. Chez le primate, à la différence du rongeur, le striatum dorsal est subdivisé en deux sous-parties : le noyau caudé, essentiellement ciblé par des afférences préfronto-corticales, et le putamen, ciblé par des afférences motrices et somatosensorielles. La partie la plus ventrale du striatum (noyau accumbens) peut également être subdivisée en deux sous-régions : le coeur (*core*) et la coquille (*shell*). Chez le rongeur comme chez le primate, on attribue à certaines divisions du striatum des fonctions biologiques spécifiques (Voorn et al., 2004)(Nicola, 2007)(Kreitzer, 2009)(Yin et Knowlton, 2006)(Burton et al., 2015) :

- le striatum dorsomédian (*dorsomedial striatum* ou DMS en anglais), qui reçoit des afférences en provenance des aires corticales motrices, participe à l'apprentissage spatial et aux fonctions exécutives
- le striatum dorsolatéral (*dorsolateral striatum* ou DLS en anglais), qui reçoit des afférences en provenance du cortex sensorimoteur, participe à l'apprentissage

procédural, à l'apprentissage des réponses conditionnées, à l'habituation et au contrôle sensorimoteur

- le striatum ventral (ou noyau accumbens, NAc), qui reçoit des afférences en provenance du cortex frontal et des régions limbique, participe aux comportements appétitifs, à la consolidation (*reinforcement*), et aux apprentissages inversés.

Le striatum dorsal est donc essentiellement lié aux fonctions motrices et associatives, alors que le striatum ventral est relié à des fonctions plus limbiques. Néanmoins il a été démontré que les prises de décision qui précèdent l'élaboration du mouvement et des réponses comportementales sont gouvernées par les processus d'apprentissage motivé par la récompense et les réponses conditionnées par les stimuli sensoriels.

2 - Compartiments patches/matrix

Les premières indications de l'existence de compartiments dans le striatum proviennent d'études qui rapportent que des îlots (*patches*) de projections dopaminergiques sont distribués dans le neuropil du striatum dès les premiers stades du développement postnatal (Tennyson et al., 1973). Ces îlots, également appelés striosomes, représentent 10% du volume striatal. Les neurones dans ces régions *patches* sont les premiers à se développer dans le striatum, et également la cible des premiers faisceaux dopaminergiques à se former dans le striatum. Les neurones striataux se développant plus tardivement remplissent les régions matricielles aux alentours (*matrix*) (van der Kooy et Fishell, 1987)(Figure 2e). Les deux types de MSNs sont retrouvés de façon égale dans les compartiments *patches* et *matrix* (Gerfen et Young, 1988), mais ils reçoivent et émettent des projections afférentes et efférentes spécifiques suivant le compartiment considéré (Gerfen, 1992). Par exemple, les MSNs striatonigraux des striosomes projettent vers la substance noire *pars compacta* plutôt que vers la SNr.

Même si le striatum est en apparence plutôt homogène, il est possible d'utiliser des marqueurs neurochimiques pour révéler ces deux compartiments : notamment la calbindine (Gerfen et al., 1985) et l'acétylcholinestérase (enzyme de dégradation de l'acétylcholine) (Graybiel et Ragsdale, 1978) pour marquer la matrice, et les récepteurs μ opioïdes (Herkenham et Pert, 1981) pour marquer les striosomes.

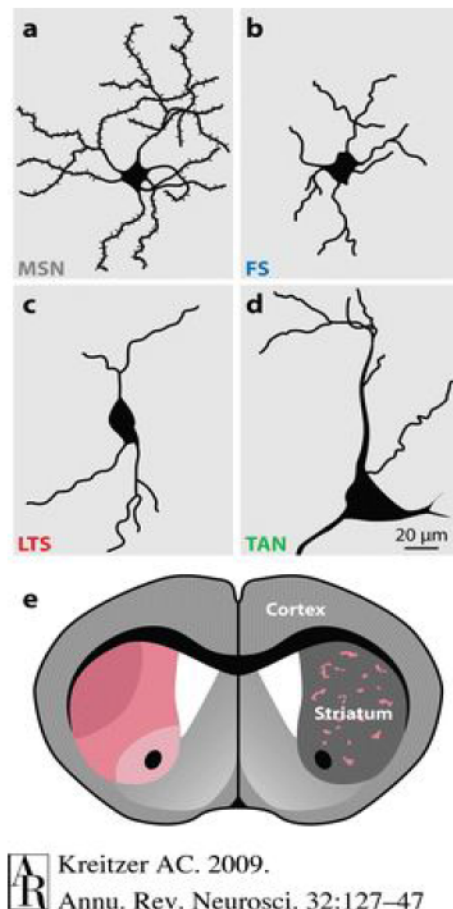


Figure 2 : Types cellulaires et organisation fonctionnelle du striatum

Représentations schématiques d'un MSN (a), d'un interneurone GABAergique parvalbumine⁺ ou *fast spiking* (b), d'un interneurone GABAergique *low threshold spiking* (c), et d'un grand interneurone cholinergique non épineux (d). Schéma d'une coupe coronale de cerveau de souris présentant les grandes divisions et compartiments du striatum (e) : à gauche, les divisions dorsolatérale, dorsomédiale et ventrale; à droite les compartiments patch (rose) et matrix (gris) (d'après Kreitzer, 2009; Kawaguchi et al., 1995).

3. Les différents neurones du striatum

Du point de vue anatomique, le striatum renferme deux classes de neurones : les neurones épineux ou MSNs mentionnés précédemment, constituant les voies directe et indirecte du circuit des ganglions de la base (car projetant hors du striatum), et les interneurones non épineux (Kawaguchi et al., 1995)(Tepper et Bolam, 2004)(Figure 2).

Les MSNs des voies directe et indirecte sont les principaux neurones du striatum (Bishop et al., 1982; DiFiglia et al., 1976; Wilson et Groves, 1980).

Ce sont des neurones GABAergiques (Kita et Kitai, 1988), d'une taille moyenne de 12 μm chez la souris, présentant des dendrites recouverts de nombreuses épines (Wilson et Groves,

1980)(Figure 2a). Chez le rat, on estime le nombre total de MSNs à près de 5,6 millions (Oorschot, 1996), contre 110 millions chez l'homme (Schröder et al., 1975). Les deux sous-populations de MSNs (striato-nigraux et striato-pallidaux) sont égales en nombre, et distribuées de façon assez homogène dans le striatum (Gerfen et Young, 1988).

Au repos, le potentiel de membrane des MSNs est aux alentours de -90 mV (Gerfen et Surmeier, 2011; Kreitzer, 2009) du fait de l'expression de canaux potassiques entrants rectifiants (Kirs, *inwardly rectifying potassium channels*), qui bloquent les dépolarisations de la membrane en réponse aux stimuli excitateurs provenant du cortex cérébral, de l'amygdale et de l'hippocampe. L'excitabilité des MSNs striatopallidaux est par ailleurs légèrement supérieure à celle des MSNs striatonigraux due à une expression plus faible de canaux Kirs (Nisenbaum et al., 1996; Gertler et al., 2008; Planert et al., 2013). Chez l'animal éveillé, les MSNs produisent des événements de dépolarisation brefs, séparés par des périodes de quiescence (Kimura, 1990; Schultz et Romo, 1988). Les dépolarisations brèves sont associées à l'initiation, à l'exécution, et à la terminaison de certains comportements moteurs (Kimura, 1990; Schultz et Romo, 1988), mais peuvent avoir lieu chez l'animal immobilisé (Wilson et Groves, 1981).

Les interneurones striataux sont minoritaires (Bishop et al., 1982; DiFiglia et al., 1976), par définition ne projettent que localement au sein du striatum (vers les MSNs ou autres interneurones), sont ciblés par les afférences corticales et thalamiques, et ont pour principale fonction celle d'inhiber les sorties striatales (Tepper et al., 2004; Bolam et al., 2000). Parmi ces interneurones on retrouve les grands neurones cholinergiques non épineux (ou *Tonically active neurons* en anglais, TANs; jusqu'à 40 µm de diamètre), et trois types d'interneurones GABAergiques non épineux (Kawaguchi et al., 1995; Bolam et al., 2000; Tepper et Bolam, 2004; Kreitzer, 2009). Ces trois types d'interneurones peuvent être distingués suivant des critères biochimiques : 1) les interneurones exprimant la parvalbumine également appelés interneurones "fast spiking", 2) ceux exprimant la somatostatine, le neuropeptide Y, et la NOS (*Nitric oxide synthase*), également appelés interneurones "low threshold spiking", 3) et ceux exprimant la calrétinine.

4. Distinction biochimique entre les MSNs de type D1 et D2

Traditionnellement on distingue les deux groupes de MSNs suivant leurs sites de projection, comme décrit précédemment (Gerfen et Young, 1988). Néanmoins, les nombreuses avancées faites dans les techniques de marquage des circuits neuronaux, avec des rapporteurs optiques et moléculaires notamment, ont révélé une dichotomie nette entre les neurones striato-nigraux et striato-pallidaux, tant au niveau moléculaire (Gerfen et al., 1990; Bateup et al., 2008, 2010; Valjent et al., 2009; Gerfen et Surmeier, 2011), anatomique (Gertler et al., 2008) que physiologique (Table 1).

	Striatonigral (D1R) MSNs	Striatopallidal (D2R) MSNs	References
Morphology			
Intra-striatal projections	More primary dendrites	Less primary dendrites	[21]
Intrinsic properties	To D1R-MSNs	To D1R-MSNs and D2R-MSNs	[60]
- Excitability	- Lower	- Higher	[21,61,62]
- Action potential back propagation (APBP)	- Less distal APBP	- More distal APBP	[63]
Cortico-striatal synapses			
- Presynaptic activation	- Lower	- Higher	[61,62]
- GABAA tone	- Weaker	- Stronger	[64,65]
- LTD	- mGluR, Cav1.3, D2-dependent	- mGluR, Cav1.3, eCB, D2-dependent	[62,66-68]
- LTP	- D1/NMDA-dependent	- A2a/NMDA-dependent	[66]
Intracellular signaling			
DARPP-32 regulation			
- Cocaine	- ↑ P-Thr34, ↓ P-Thr75	- ↓ P-Thr34, ↑ P-Thr75	[43]
- Haloperidol	- No effect	- ↑ P-Thr34	[43]
- Clozapine	- ↑ P-Thr75	- ↑ P-Thr34, ↑ P-Thr75	[43]
- Caffeine	- No effect	- ↑ P-Thr75	[43]
MAPK/ERK signaling			
- Cocaine	- ↑ P-ERK, ↑ P-MSK, ↑ P-H3	- No effect	[17]
- Haloperidol	- No effect	- ↑ P-ERK, ↑ P-MSK, ↑ P-H3	[40]
- L-DOPA after 6-OHDA lesion	- ↑ P-ERK, ↑ P-MSK, ↑ P-H3	- No effect	[36]
Spine plasticity			
- Cocaine	- ↑ stable spines	- ↑ transient spines	[54]
- 6-OHDA lesion	- No effect	- ↓ spines	[37]

Table 1 : Principales différences biochimiques opposant les MSNs D1 et D2

(D'après Valjent et al., 2009)

Les neurones striato-nigraux expriment sélectivement des récepteurs D₁ à la dopamine (D₁Rs), la dynorphine, la substance P, les récepteurs muscariniques M₄ (M₄Rs), et les récepteurs à l'adénosine A₁ (A₁Rs). Les neurones striato-pallidaux quant à eux expriment sélectivement des récepteurs D₂ à la dopamine (D₂Rs), l'enképhaline, et les récepteurs A_{2A} à l'adénosine (A_{2A}Rs). Dans le striatum dorsal, un faible nombre de MSNs (2-5%) co-expriment les récepteurs D₁ et D₂, tandis que dans le striatum ventral, la proportion de MSNs exprimant simultanément les récepteurs D1 et D2 augmente à près de 20% (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gagnon et al., 2017; Valjent et al., 2009). Cette dichotomie, qui pendant longtemps a fait l'objet de controverses, est maintenant bien acceptée. L'utilisation de souris transgéniques BAC (*Bacterial artificial chromosome*) - qui permet de

faire exprimer aux neurones des rapporteurs fluorescents, sous le contrôle de promoteurs spécifiques (e.g. promoteurs des récepteurs D₁ ou D₂), a définitivement confirmé l'expression séparée des récepteurs D₁ et D₂ par les MSNs des voies directe et indirecte, respectivement (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Valjent et al., 2009; Gagnon et al., 2017).

Concernant les MSNs D1/D2, co-exprimant les récepteurs D1 et D2, formant une population neuronale distincte mais minoritaire dans le striatum (<5%) : ces derniers sont morphologiquement plus petits que les MSNs D1 ou D2, et possèdent un arbre dendritique moins développé, avec moins d'épines (Gagnon et al., 2017). Leur densité d'épines dendritiques, comme celle des MSNs D1 ou D2, est fortement réduite chez la souris subissant une lésion 6-OHDA (modèle toxique de la maladie de Parkinson), mais à l'opposé des MSNs D1 ou D2, l'étendue de l'arborisation dendritique des MSNs D1/D2 est inchangée.

5. Connectivité des MSNs

Cinq ou six dendrites primaires recouvrent le corps cellulaire des MSNs, se divisent une ou deux fois pour former des dendrites secondaires et tertiaires, pouvant parcourir des volumes d'environ 250-500 µm de diamètre (DiFiglia et al., 1976; Wilson et Groves, 1980). Les dendrites proximaux (primaires) ont un diamètre assez petit, et sont plutôt dépourvus d'épines, alors que les dendrites distaux (démarrant à 20 µm du corps cellulaire) sont recouverts d'épines (DiFiglia et al., 1976; Wilson et Groves, 1980). L'axone principal de chaque MSN projette hors du striatum, mais également au sein du striatum pour former des collatérales, qui se divisent de façon répétée pour former un réseau qui recouvre pratiquement tout l'arbre dendritique (Wilson et Groves, 1980).

Les MSNs reçoivent essentiellement des afférences glutamatergiques excitatrices, en provenance du cortex cérébral (Gerfen, 1989; Somogyi et al., 1981), du thalamus (Lacey et al., 2005; Raju et al., 2008), et de l'amygdale. La majorité des terminaisons axonales corticales et thalamiques, que l'on peut distinguer par des techniques de marquage (marqueur VGluT1 pour les terminaisons corticostriatales, marqueur VGluT2 pour les terminaisons thalamostriatales), forme des synapses asymétriques sur les épines des dendrites des MSNs (environ 95% pour les terminaisons corticales et 71% pour les terminaisons thalamiques (Kemp et Powell, 1971b; Smith et al., 2004; Moss et Bolam, 2008). D'autres afférences

modulent la réponse des MSNs à ces entrées excitatrices : ce sont par exemple les afférences dopaminergiques de la substance noire (Smith et al., 1994), et les afférences GABAergiques des collatérales provenant d'autres MSNs (collatérales D1 vers D2 essentiellement) ou des interneurones (Tepper et al., 2004).

II. Biologie de la neuromodulation dopaminergique dans le striatum

La signalisation/neuromodulation par la dopamine (DA) joue un rôle important dans des fonctions et comportements multiples, notamment dans le contrôle moteur, la poursuite des récompenses et comportements associés, l'affect/aversion, la régulation du sommeil, la motivation, l'attention, la cognition, l'olfaction, la vision, la régulation hormonale, la régulation sympathique ou encore la fonction érectile. Plusieurs maladies sont décrites liées à sa dégénération ou à son dysfonctionnement, notamment la maladie de Parkinson (DA déficiente), la schizophrénie (DA agissant de façon excessive), ou encore les addictions (Schultz, 2007a,b; Beaulieu et al., 2015). Ce sont les travaux de Arvid/Greengard/Kandel dans les années 1950s qui les premiers proposent un rôle neuromodulateur à la dopamine, dans la régulation du contrôle moteur. Avant cela, la dopamine n'était considérée qu'au titre de précurseur de synthèse, simple intermédiaire métabolique dans la biogenèse des catécholamines que sont la noradrénaline et l'adrénaline (Moore et Bloom, 1978).

1. Métabolisme de la dopamine dans les neurones du mésencéphale

Du point de vue de l'histochimie, deux marqueurs constants caractérisent les neurones dopaminergiques (retrouvés par techniques de rtPCR ou analyse immunohistochimique) : la tyrosine hydroxylase et le transporteur de la recapture de la dopamine (Haber et al., 1995). On retrouve aussi dans ces neurones de façon plutôt spécifique : la L-DOPA décarboxylase et le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2)(Fuxe et al., 2010). Dans ces neurones, la dopamine est produite directement au niveau des varicosités terminales, et sa synthèse est accélérée par les dépolarisations de membrane, suite à l'activation rapide de la tyrosine hydroxylase (TH)(Zigmond et al., 1989). La TH (quatre monomères identiques de poids moléculaire respectif ~ 60 kDa) est une oxydase soluble à fonction mixte qui catalyse la transformation de la tyrosine (réaction de meta-hydroxylation) en L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phénylalanine), en utilisant le fer et la tétrahydrobioptérine comme cofacteurs. Son Km pour la tyrosine est de l'ordre du micromolaire, et la TH est l'enzyme

limitante dans la production de DA dans les neurones car saturée par les fortes concentrations en tyrosine endogène.

Seules de faibles quantités de L-DOPA sont retrouvées dans les tissus, dû à l'activité de la DOPA décarboxylase (spécialisée dans la décarboxylation des acides aminés aromatiques) qui convertit aussitôt la DOPA en dopamine (Christenson et al., 1970). La DOPA décarboxylase utilise le pyridoxyl phosphate comme cofacteur enzymatique, possède un K_m bas pour la L-DOPA, et une vitesse de catalyse importante. Elle est retrouvée dans de nombreux tissus et populations cellulaires de l'organisme incluant par exemple les neurones sérotoninergiques où elle permet la conversion du 5-hydroxytryptophane en sérotonine. De nombreux inhibiteurs de cette enzyme sont utilisés en thérapeutique (carbidopa, benserazide, alpha-méthyl-dopa) (Smith et al., 2012). Après sa synthèse cytosolique, la dopamine est stockée dans des vésicules (~ 40 nm de diamètre) essentiellement localisées au niveau des varicosités des terminaisons axonales, et à de fortes concentrations intravésiculaires (Omiatek et al., 2013). Dans les vésicules sont aussi stockées d'autres protéines et petites molécules, comme les chromogranines, le glutamate, les ions chlorures, le GABA ou encore l'ATP. La vésiculation est médiée par le transporteur vésiculaire des monoamines de type 2 (VMAT2) (Nirenberg et al., 1996), un homologue aux pompes de résistance aux drogues retrouvées chez certaines familles de bactéries, connu pour sa capacité à transporter les amines biogènes, incluant la tryptamine et la tyramine, ainsi que les amphétamines. Le VMAT a une affinité forte pour la réserpine (inhibiteur spécifique irréversible), qui *in vivo* bloque la vésiculation des monoamines endogènes. Les traitements à la réserpine ont donc pour effet de dépléter les niveaux en catécholamines dans les neurones. Enfin lorsqu'un potentiel d'action atteint les terminaisons dopaminergiques, l'augmentation des niveaux intracellulaires en calcium induit la fusion des vésicules avec la membrane, et l'exocytose/libération de la dopamine dans le milieu extracellulaire. L'augmentation des niveaux de dopamine dans l'espace extracellulaire entraîne aussi une élévation des niveaux de ses métabolites dans les tissus et fluides alentours (Hornykiewicz, 2001). Les métabolites majeurs de la dopamine sont des produits de O-méthylation et de désamination oxydative. Ce sont par exemple : l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, la 3-méthoxytyramine et l'acide homovanillique. Ces derniers sont obtenus par l'action coordonnée des monoamines oxydases (MAOs) (Shih, 1991) et des catéchol-O-méthyltransférases (COMTs) (White et Wu,

1975), qui sont les cibles de thérapeutiques anti-parkinsoniennes, au même titre que la DOPA décarboxylase (Smith et al., 2012).

Enfin les actions (pré- et post-synaptiques) de la dopamine sont principalement terminées par un processus de recapture. C'est la protéine membranaire DAT (*dopamine transporter*) qui assure la recapture (Masson et al., 1990; Giros et al., 1996; Samadi et al., 2007), et que l'on retrouve exprimée le long des fibres dopaminergiques mais aussi dans quelques cellules gliales. La recapture contribue grandement au maintien des niveaux toniques en DA extracellulaire (Chergui et al., 1994). La ouabaïne (inhibiteur des Na⁺/K⁺-ATPases) et la vératridine (qui ouvre les canaux sodiques) inhibent la recapture. La cocaïne, le méthylphénidate (Ritaline*) et les antidépresseurs tricycliques sont des inhibiteurs puissants du DAT, et exercent ainsi des effets dopaminomimétiques indirects en empêchant la recapture de la DA présente dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs la neurotoxine 6-OHDA, utilisée pour modéliser la maladie de Parkinson chez l'animal, utilise ce processus de recapture active pour être accumulée dans les neurones dopaminergiques, et les détruire en amorçant toute une série d'événements oxydatifs (e.g. libération de peroxyde d'hydrogène par auto-oxydation, formation de dérivés quinones)(Blum et al., 2001). La dopamine en stimulant les autorécepteurs D₂-like des terminaisons présynaptiques exerce par ailleurs une régulation négative sur son turnover, via trois grands mécanismes : 1) l'inhibition de la TH et de la synthèse de dopamine, 2) l'inhibition de l'exocytose via action sur des canaux ioniques et sur le potentiel de membrane, et 3) l'augmentation de la recapture (Zhang et al., 2009; Ford, 2014; Rice et al., 2011). Des hétérorécepteurs peuvent également moduler l'exocytose de la DA au niveau des terminaisons dopaminergiques, en particulier les récepteurs au glutamate, au GABA, ou encore à l'acétylcholine.

Deux modes de dépolarisation :

C'est dans les années 1980s que pour la première fois les neurones dopaminergiques ont été caractérisés du point de vue électrophysiologique (Grace et Bunney, 1984a,b). Aujourd'hui, deux motifs-types de dépolarisation, tonique ou phasique, sont décrits dans des études chez l'animal (Grace et Bunney, 1984a,b; Gonon, 1988; Seamans et Yang, 2004; Hauber, 2010). Via leur couplage à la signalisation calcique, ces deux modes de dépolarisation régulent l'exocytose de la dopamine vésiculée dans les terminaisons dopaminergiques (Rice et al.,

2011), ainsi que le profil spatiotemporel des niveaux en dopamine dans le cerveau (Rice et al., 2011; Zhang et al., 2009).

Lorsque l'animal n'est pas activement engagé dans une tâche comportementale, les neurones dopaminergiques ont une activité électrique continue de basse fréquence (0,1-10 Hz), pendant laquelle ils propagent des potentiels d'action individuels (mode *pacemaker*) (Bayer et al., 2007) (Schultz, 1986), caractérisés par leur relativement longue durée (2 à 4 ms) et leur profil polyphasique (montée biphasique et AHP prominent) (Diana et al., 1989). Un potentiel d'action unique, ne durant pourtant que quelques millisecondes, peut élever sur des durées cent fois plus longues les niveaux extracellulaires en dopamine. De nombreux canaux, comme les canaux Kv4.3, HCN et SK3, permettent la génération et la régulation d'une activité électrique tonique (Grace et Bunney, 1984a,b), et cette dernière présente la particularité d'être inhibée par l'activation d'autorécepteurs de type D₂ (Ford, 2014). Les dépolarisations de basse fréquence aboutissent à la libération de faibles quantités de dopamine et au maintien d'un niveau tonique de dopamine extracellulaire (10-100 nM) (Keefe et al., 1993; Floresco et al., 2003; Venton et al., 2003) dans les structures cibles comme le striatum (Schultz, 2007; Zhang et al., 2009). Les niveaux toniques de dopamine permettent aux différents circuits neuronaux ciblés par la dopamine d'assurer leur fonction normale. Ils peuvent être régulés et évoluer sur des échelles de temps assez longues, en fonction de l'état comportemental de l'animal comme dans les situations de doute, de stress, ou de récompense (Schultz, 2007). Les neurones dopaminergiques n'ont pas tous une activité spontanée : au moins 50% d'entre eux ne dépolarisent pas au repos. C'est essentiellement le tonus inhibiteur exercé par les neurones GABAergiques du pallidum ventral qui limite l'activité des neurones dopaminergiques (Floresco et al., 2003).

Au cours de contextes/stimuli environnementaux particuliers les potentiels d'actions uniques du mode de dépolarisation régulier (*pacemaker*) sont parfois remplacés par des trains/rafales de 2-10 potentiels d'action, déchargés à plus haute fréquence (20-80 Hz) (Schultz, 2007; Schultz et Romo, 1990; Grace et Bunney, 1984a). L'augmentation de la fréquence des dépolarisations est régulée par les récepteurs ionotropiques au glutamate de type NMDA, activés par les signaux glutamatergiques provenant en particulier du noyau subthalamique et du tegmentum pédonculopontin (Grace et Bunney, 1984a; Floresco et al. 2003). Initialement

décrit par Schultz, ce mode de dépolarisation en rafales (ou mode *burst-firing*) a lieu généralement dans des échelles de temps restreintes (~ 100-500 ms)(Gonon, 1988, 1997; Schultz, 2007). Il se met en place avec une latence de 40-100 ms après la perception par l'animal d'un stimulus de nouveauté (Ljungberg et al., 1992), de salience (Mirenowicz et Schultz, 1996; Roitman et al., 2008), ou de récompense inattendue, et est un déterminant de l'apprentissage par renforcement positif (Waelti et al., 2001; Arbuthnott et Wickens, 2007; Schultz, 2007; Bromberg-Martin et al., 2010). On le retrouve aussi associé aux processus de sélection de l'action, et à l'initiation de mouvements et réponses locomotrices spécifiques (Howe et Dombeck, 2016; Schultz, 2007). Il entraîne alors l'exocytose de grandes quantités de dopamine, dont la concentration extracellulaire atteint l'échelle du μM -mM pendant plusieurs secondes, en partie dû à la baisse d'efficacité du DAT qui ne parvient plus à retirer efficacement la DA de l'espace extracellulaire (Gonon, 1988; Floresco et al., 2003; Venton et al., 2003; Goto et al., 2007; Zhang et al., 2009). A l'opposé l'omission d'une récompense attendue ou les punitions provoquent des silences/pauses (jusqu'à ~400 ms) de l'activité électrique des neurones dopaminergiques, et une chute subséquente des niveaux toniques en dopamine (Schultz, 1998; Mastumoto et Hikosaka, 2009).

2. La voie dopaminergique nigro-striée

Les neurones dopaminergiques du mésencéphale constituent le plus important des systèmes dopaminergiques du cerveau (Hornykiewicz et Kish, 1987; Bjorklund et Dunnet, 2007).

Initialement trois grands groupes de neurones dopaminergiques y ont été identifiés (Moore et Bloom, 1978) : les groupes A10, A9, et A8, localisés respectivement dans 1) la VTA, région la plus ventro-médiale du mésencéphale, 2) la substance noire (SN) et ses deux segments, le segment *pars compacta* (SNpc, qui doit son nom au regroupement dense/compact des neurones dopaminergiques résidents) et le segment *pars reticulata* (SNr), où la distribution des neurones dopaminergiques est plus clairsemée, 3) et l'aire rétro-rubrale (située dans l'axe dorso-caudal de la substance noire)(Bjorklund et Dunnett, 2007; Fuxe et al., 2010). Chez l'homme, ce sont près de 500.000-1.000.000 neurones dopaminergiques que l'on dénombre dans ces noyaux, soit environ 0,001% de l'ensemble des neurones du cerveau (0,03% chez le rongeur). Malgré leur nombre relativement restreint, les neurones dopaminergiques parviennent à innover efficacement de très nombreux territoires (aires corticales et

sous-corticales) via leurs axones très développés (Bjorklund et Dunnett, 2007; Matsuda et al., 2009). Quatre grandes voies dopaminergiques naissent de ces différents noyaux : 1) la voie nigrostriée, impliquée dans la production motrice et qui relie la SN au striatum, 2) la voie méso-limbique qui relie le mésencéphale aux structures limbiques comme l'amygdale, l'hippocampe ou l'accumbens, 3) la voie mésocorticale, impliquée dans les processus exécutifs et qui relie le mésencéphale aux régions frontales du cortex, 4) et la voie tubéro-infundibulaire (tubéro-hypophysaire) essentiellement impliquée dans la régulation neuroendocrine. Parmi ces quatre voies, la voie dopaminergique nigro-striée est la principale, et dégénère au cours de la maladie de Parkinson, affectant l'activité des voies directe et indirecte des ganglions de la base, et provoquant ainsi l'apparition des troubles moteurs de la maladie (Smith et Kieval, 2000; Smith et Villalba, 2008).

L'essentiel de la dopamine cérébrale est retrouvé concentré dans le circuit des ganglions de la base, et de tous les noyaux constituant ce circuit les fibres dopaminergiques de la SN innervent principalement le striatum (Bolam et al., 2000; Kreitzer et Malenka, 2008; Ena et al., 2011). Hors du système des ganglions de la base ce sont surtout des régions comme les aires limbiques et corticales (dont cortex préfrontal) qui sont innervées (Bjorklund et Dunnett, 2007).

Les projections reliant le mésencéphale au striatum (voies nigrostriée et mésolimbique) ont une certaine organisation topographique : les neurones dopaminergiques de la région médiane du mésencéphale (VTA) projettent vers les parties ventrales du striatum et vers l'accumbens, alors que les neurones dopaminergiques localisés de façon plus latérale (SNpc et aire rétro-rubrale) projettent surtout vers la partie dorsale du striatum. Et pour complexifier un peu plus, différents sous-groupes de neurones dopaminergiques ciblent de façon différentielle les compartiments *patches* ou *matrix* du striatum (Gerfen et al., 1987a,b). Dans la SNpc l'on peut distinguer un segment dorsal et un segment ventral. Le segment dorsal de la SNpc est continu avec la VTA, et les neurones de cette région (marquage positif à la calbindine) étendent leurs dendrites dans les plans de la SNpc médiane et latérale. Le segment ventral de la SNpc est organisé en deux sous-parties, dont l'une est adjacente au segment dorsal, et où les neurones (négatifs à la calbindine) étendent leurs dendrites ventralement dans la SNr. Des études de traçage axonal ont montré que les projections des neurones de la VTA, du segment dorsal de la SNpc et de l'aire rétro-rubrale ciblent préférentiellement les compartiments matriciels du

striatum, alors que les neurones des deux sous-parties du segment ventral de la SNpc visent préférentiellement les striosomes (Gerfen et al., 1987a,b). Des précisions ont été apportées par Matsuda et collègues en 2009 qui montrent que les neurones dopaminergiques des segments dorsal et ventral de la SNpc projettent en réalité leurs axones dans les deux compartiments *patch* et *matrix* du striatum, mais qu'ils tendent à favoriser l'un ou l'autre (Matsuda et al., 2009).

Connectivité des neurones dopaminergiques :

Les segments *pars compacta* et *pars reticulata* de la SN reçoivent à peu près les mêmes innervations, et les dendrites des neurones de la SNpc établissent en proportion autant de synapses GABAergiques et glutamatergiques. Le striatum d'une part est le principal noyau émettant en direction de la SNpc (Smith et Bolam, 1990) : les projections striatales vers la SNpc proviennent préférentiellement des striosomes, alors que les neurones striataux de la matrix projettent surtout vers le pallidum et la SNr. La SN reçoit aussi des entrées inhibitrices en provenance du GPe (SNr principalement), des afférences cholinergiques provenant essentiellement du noyau pédonculopontin, des influx provenant de l'amygdale (à l'exception de la SNr) (Gonzales et Chesselet, 1990), des afférences inhibitrices provenant de l'habénula latérale (Herkenham et Nauta, 1979) et du noyau tegmental rostromédian. Enfin il existe une innervation notable (et reverse) des neurones dopaminergiques de la SN par les neurones glutamatergiques des régions corticales et sous-corticales du cortex, de l'hippocampe, de l'amygdale et du thalamus.

Transmission volumique du signal dopaminergique dans le striatum :

Les axones dopaminergiques peuvent établir des contacts synaptiques avec les MSNs du striatum au niveau des arbres dendritiques (30-45% des synapses) et du cou des épines dendritiques (50-65% des synapses), là où se connectent les terminaisons cortico-thalamiques (Freund et al., 1984). Néanmoins les cibles post-synaptiques de la DA (les récepteurs D₁- et D₂-like, voir chapitre 3) sont localisés à distance de ces synapses (Caillé et al., 1996; Hersch et al., 1995; Yung et al., 1995), et la DA libérée par les neurones dopaminergiques doit diffuser depuis ses sites de libération pour les activer (on parle alors de transmission extrasynaptique, ou volumique) (Pickel et al., 1996; Descarries et al., 1996). La densité des sites de libération de la DA est néanmoins très importante dans le striatum, avec une distance

moyenne entre deux sites de libération de 4 μm (Doucet et al., 1986). Le rayon moyen de diffusion de la DA depuis son site de libération est estimé à 7 μm (Rice et Cragg, 2008), et sa demi-vie *in vivo* est estimée à 30 millisecondes (Gonon et al., 2000; Venton et al., 2003). La recapture de la DA par le DAT est le principal facteur limitant son rayon de diffusion dans l'espace extracellulaire. Chez l'individu parkinsonien ce dernier peut être augmenté jusqu'à 32 μm suite à la prise de L-DOPA (conséquence de la perte des terminaisons dopaminergiques striatales et de la déplétion en DAT)(Mosharov et al., 2015).

Par ailleurs seules 20% des épines des MSNs engagées dans un contact synaptique avec les afférences corticales sont aussi apposées à un axone dopaminergique, et 9% réalisent effectivement une synapse dopaminergique. Seules 27% des épines des MSNs engagées dans un contact synaptique avec les terminaisons thalamiques sont également apposées à un axone dopaminergique, et 9% réalisent une véritable synapse dopaminergique (Moss et Bolam, 2008).

3. Contrôle dichotomique des voies directe et indirecte par la dopamine

A l'échelle du striatum, l'une des principales actions de la DA consiste à moduler le flux des informations excitatrices provenant du cortex et du thalamus, notamment via ses effets sur l'excitabilité des neurones (Nicola et al., 2000), médiés par les récepteurs dopaminergiques des types D_1 et D_2 (Surmeier et al., 2007; Shen et al., 2008; Wickens, 2009; Gerfen et Surmeier, 2011; Tritsch et Sabatini, 2012) :

- 1) la DA augmente l'excitabilité intrinsèque des MSNs de type $D1$ (striato-nigraux) et induit une potentiation à long terme (ou LTP, *long-term potentiation*) des synapses glutamatergiques corticostriatales (facilite l'activation de la voie directe)
- 2) la DA diminue l'excitabilité intrinsèque des MSNs de type $D2$ (striato-pallidaux) et induit une dépression à long terme (ou LTD, *long-term depression*) des synapses glutamatergiques corticostriatales (empêche l'activation de la voie indirecte). Jusqu'à récemment, ces effets dichotomiques de la DA sur le fonctionnement des MSNs de type $D1$ et $D2$, et les mécanismes permettant les LTP/LTD dans le striatum ont été sujet à controverse, notamment parce que les MSNs sont mélangés de façon assez homogène dans le striatum, et difficilement distinguables du point de vue de

l'électrophysiologie. C'est la technologie des souris BAC qui, couplée à l'optogénétique, a permis de clarifier la nature des effets générés par la DA dans le striatum, et de confirmer les prédictions de base du modèle classique d'organisation des voies directe et indirecte (Surmeier et al., 2007; Gertler et al., 2008; Obeso et al., 2008; Valjent et al., 2009; Kravitz et al., 2010; Cerovic et al., 2013; Thibault et al., 2013). Surmeier et collègues (Shen et al., 2008) montrent par exemple que la LTP a lieu lorsqu'une activité présynaptique précède l'activité postsynaptique, et c'est le phénomène inverse pour la LTD (l'activité postsynaptique doit précéder l'activité présynaptique). Les deux formes de changements de plasticité peuvent se produire dans les MSNs de type D2, et sont bloquées par les antagonistes D₂ (mais pas D₁). Dans les MSNs de type D1 la LTP est médiée par les récepteurs-canaux au glutamate NMDA (*N-Methyl-D-Aspartate*), et la LTD, bloquée par les récepteurs métabotropiques au glutamate mGlu5, et difficile à produire si le récepteur D₁ n'est pas bloqué.

III. Transduction du signal dopaminergique dans le striatum

1. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)

De nombreux RCPGs sont exprimés dans le striatum (Table 2, Samadi et al., 2007), parmi lesquels se trouvent les récepteurs à la dopamine. Les RCPGs permettent une transduction lente des signaux dans la cellule, en régulant notamment les niveaux du second messager adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et l'activité de ses différents effecteurs.

Major neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia and their receptors

Neurotransmitter/neuro-modulator	Ionotropic receptor			Metabotropic receptor		
Dopamine				D1, D2, D3, D4, D5		
Glutamate	NMDA subunits: NR ₁ NR _{2A} NR _{2B} NR _{2C} NR _{2D} NR _{3A}	AMPA subunits: GluR ₁ GluR ₂ GluR ₃ GluR ₄	Kainate subunits: GluR ₅ GluR ₆ GluR ₇ KA ₁ KA ₂	Group I mGluR ₁ mGluR ₅	Group II mGluR ₂ mGluR ₃	Group III mGluR ₄ mGluR ₆ mGluR ₇ mGluR ₈
GABA	GABA _A , GABA _C			GABA _H (GABA _B R1 - GABA _B R2)		
Acetylcholine	Nicotinic			Muscaritic (M1, M2, M3, M4, M5)		
Adenosine				A1, A2A, A2B, A3		
Cannabinoid				CB1, CB2, CB3?		
Serotonin	5-HT ₃			5-HT1A, B, D, E, F; 5-HT2A, B, C, 5HT4; 5-HT5A, B; 5-HT6; 5-HT7		
Neurokinins (NKs) (Substance P/NK-1, Substance K/NK-2, Neuromedin K/NK-3)				NK-1R (SPR), NK-2R (SKR), NK-3R (NKR)		
Opioids (Enkephalin; Dynorphin)				μ, κ, δ		
Neurotensin				NTS1, NTS2, NTS3		
Neuropeptide Y (NPY)				NPYRs (6 known receptors)		
Somatostatin (SOM)				SSTRs (5 known receptors)		
Angiotensin				AT1, AT2, AT3		
Cholecystokinin				CCKAR, CCKBR		

Table 2: Principaux récepteurs exprimés dans le striatum (extrait de Samadi et al., 2007).

Les récepteurs à la dopamine appartiennent à la classe “A” des RCPGs, ou famille rhodopsine, la plus grande des familles de RCPGs. Les récepteurs de type D₁ sont généralement couplés aux protéines G de type G_s, et une particularité du striatum est d’exprimer de forts niveaux de la protéine G_{olf} au lieu de G_s (Drinnan et al., 1991), et c’est G_{olf} qui assure le couplage entre le récepteur D₁ et les cyclases (Hervé et al., 1993).

A l’état de repos la protéine G est ancrée à la membrane sous sa forme trimérique $\alpha\beta\gamma$ (ancrage via γ), et la sous-unité α lie du GDP. La liaison du ligand au RCPG (stoechiométrie 1:1) provoque une succession d’interactions et de changements conformationnels, permettant *in fine* le recrutement de la protéine G. La protéine G peut parfois être retrouvée “pré-couplée” au RCPG, avant même que le récepteur ne soit stimulé (le récepteur est alors dans son état de haute affinité, voir paragraphe sur les récepteurs D₁ et D₂-like). Le couplage entre la protéine G et le récepteur activé provoque un échange du GDP par du GTP. La sous-unité α -GTP et le dimère $\beta\gamma$ se dissocient alors, pour ensuite respectivement moduler l’activité de leurs effecteurs, comme par exemple les adénylyl cyclases, productrices d’AMPc, ou encore la phospholipase C, ciblées par les sous-unités alpha. L’action des protéines G sur les effecteurs est terminée par les protéines RGS (régulatrices de la signalisation par les protéines G) qui catalysent la transformation du GTP porté par la sous-unité α libre en GDP, et son retour à l’état de repos (Xie et Palmer, 2007).

2. Les Adénylyl cyclases (ACs)

Les Adénylyl Cyclases (ACs) catalysent la conversion de l’adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique ou AMPc en la présence de Mg²⁺. Leur activité est canoniquement régulée par les protéines G de type G_s, G_{olf} et G_i (Hanoune et Defer, 2001).

Dix familles d’ACs (AC1-AC10) ont été identifiées à ce jour chez le mammifère, les neuf premières regroupant des isoformes d’ACs membranaires assez similaires, issues de 9 gènes différents (les isoformes d’AC 5/6/8 possèdent par ailleurs des variants d’épissage), et la dixième une isoforme soluble (sAC) retrouvée essentiellement dans les testicules (Patel et al.,

2001). Les neuf isoformes d'ACs membranaires sont toutes retrouvées dans le cerveau (Hanoune et Defer, 2001; Tasken et Aandahl, 2004).

L'on distingue souvent les différentes isoformes d'ACs suivant leur sensibilité au calcium : 1) les ACs positivement régulées par le complexe calcium/calmoduline (cas des ACs 1/3/8), 2) les ACs négativement régulées par de faibles concentrations en calcium (inférieures au μM) (ACs 5 et 6) ou par le complexe Ca^{2+} /calcineurine (AC9), 3) et les ACs insensibles au calcium (ACs 2/4/7). D'autres mécanismes de régulation des ACs ont également été décrits. Le dimère $\beta\gamma$ des protéines G peut réguler l'activité des ACs, au même titre que certaines protéines de signalisation telles que les kinases A et C ou encore les calcium/calmoduline kinases (voir Table 3). Enfin, toutes les ACs à l'exception de l'AC9 sont activables par la forskoline (fsk), principe actif extrait de la plante *Coleus forskohlii*, originaire d'Inde et très utilisée en médecine ayurvédique.

AC isoform	Response to cAMP signaling pathway component ^a					
	G α s	G α i	G $\beta\gamma$	FSK	Calcium	Protein kinases
AC1	↑	↓ (CaM- or FSK-stimulated activities)	↓	↑	↑ (CaM) ↓ (CaM kinase IV)	↑ PKC (weak) ↓ (CaM kinase IV)
AC2	↑	→	↑ (when stimulated by G α s)	↑		↑ (PKC)
AC3	↑	↓		↑	↑ (CaM) (in vitro) ↓ (CaM kinase II)	↑ (PKC) (weak) ↓ (CaM kinase II)
AC4	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC5	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μM)	↓ (PKA) ↑ (PKC α/ζ)
AC6	↑	↓	↓ ($\beta 1\gamma 2$)	↑	↓ (<1 μM)	↓ (PKA, PKC)
AC7	↑		↑	↑		↑ (PKC)
AC8	↑	↓ (Ca^{2+} rises)		↑	↑ (CaM)	→ (PKC)
AC9	↑	↓		↑ (weak)	↓ (calcineurin)	
sAC	→	→		→		

^a↑, positive regulatory response; ↓, negative regulatory response; →, neutral response.

Table 3 : Propriétés de régulation des dix familles d'ACs (extrait de Hanoune et Defer, 2001)

La distribution des différentes isoformes d'ACs membranaires est hétérogène dans le tissu cérébral. Dans le striatum, les ACs 2/5/8/9 sont exprimées (Mons et Cooper, 1995) majoritairement. L'ARNm de l'AC5 est fortement retrouvé dans les neurones épineux, contrairement aux messagers des isoformes 8 et 9 (Antoni et al., 1998; Patel et al., 2001). L'isoforme AC2 est principalement retrouvée dans les interneurones cholinergiques (Mons et Cooper, 1995). Les types de cyclases exprimées dans le striatum varient au cours du développement, l'expression de l'AC5 en particulier prédomine sur celle de l'AC1 à l'âge adulte (Matsuoka et al., 1997).

3. Les Phosphodiesterases (PDEs)

Les phosphodiesterases (PDEs) sont les enzymes qui hydrolysent les nucléotides cycliques et sont la principale voie de régulation négative des niveaux intracellulaires de l'AMPc (les autres voies négatives étant les "*Multi-drug Resistant Proteins*" et la perméation passive à travers la membrane). La régulation de l'activité des phosphodiesterases, que ce soit par des mécanismes biologiques ou des inhibiteurs chimiques, détermine la dynamique des signaux intracellulaires AMPc et GMPc (Keravis et Lugnier, 2012). Les phosphodiesterases présentent un intérêt particulier car la structure du site catalytique permet de créer des inhibiteurs à haute affinité et sélectivité, une propriété qui a permis à l'industrie pharmaceutique de développer de nombreux candidats médicaments. Pour cette raison, cette partie est développée plus en détail.

Onze familles de PDEs (PDE1-PDE11) ont été répertoriées chez le mammifère, rassemblant plus de 50 isoformes différentes, codées par 21 gènes différents. Les PDEs d'une même famille sont codées par 1 à 4 gènes différents, avec divers variants d'épissage alternatif.

Certaines PDEs hydrolysent spécifiquement l'AMPc (PDEs 4/7/8), d'autres le GMPc (PDEs 5/6/9), et certaines peuvent dégrader indifféremment AMPc et GMPc (PDEs 1/2/3 10/11).

Le striatum exprime de très forts niveaux de messagers de PDE1B, PDE7B et PDE10A. Les PDE2A, PDE4A, B, D, PDE8 et PDE9 sont exprimées à des niveaux plus modérés (Lakics et al., 2010; Kelly et al., 2014).

PDE1

Les PDE1s sont des PDEs cytosoliques à double spécificité de substrat, et les seules PDEs à être régulées par le calcium, via la calmoduline. La PDE1B présente une affinité (K_m) pour le GMPc légèrement supérieure à celle pour l'AMPc (K_m de 33 μM pour l'AMPc contre 5 μM pour le GMPc) (Poppe et al., 2008). Les PDE1s possèdent deux sites de régulation par le complexe calcium/calmoduline (Ca^{2+}/CaM) en région N terminale. La fixation du complexe Ca^{2+}/CaM sur ces sites de régulation augmente la vitesse d'hydrolyse des PDE1s (V_{max}) sans modifier leur affinité pour les nucléotides cycliques. La PDE1B est exprimée de façon spécifique et abondante dans les neurones épineux du striatum (Repsake et al., 1993; Omori et Kotera, 2007; Fidock et al., 2002), présente essentiellement dans le cerveau, tissu cardiaque et muscles lisses. L'importance de son rôle fonctionnel dans le striatum a été démontré chez des souris PDE1B-KO, qui présentent une hyperactivité locomotrice et une sensibilité accrue aux amphétamines (Reed et al., 2002; Ehrman et al., 2006).

PDE2

Il existe trois isoformes de PDE2s, codées par un gène unique pouvant donner trois variants d'épissage : PDE2A1, PDE2A2 et PDE2A3. Les trois isoformes se distinguent par leur segment N terminal, qui détermine leur localisation subcellulaire : les PDE2A2 et PDE2A3 sont membranaires, et la PDE2A1 est soluble (Keravis et Lugnier, 2012). D'autres localisations sont documentées pour la PDE2A : les enveloppes nucléaires (Lugnier et al., 1999) et l'appareil Golgi (Geoffroy et al., 1999). Les domaines C terminaux et activités catalytiques des trois isoformes de PDE2 sont similaires. Les PDE2s hydrolysent l'AMPc (K_m de 110 μM) et le GMPc (K_m de 31 μM) avec des vitesses de réaction (V_{max} ~200 $\mu mol/min/mg$) similaires pour les deux nucléotides cycliques (Poppe et al., 2008). Les PDE2s se distinguent par leur domaine de régulation N terminal, sensible au GMPc. Ce dernier renferme en effet deux domaines GAF : GAF A et GAF B (Martinez et al., 2002). Les domaines GAF sont très conservés dans l'évolution, et sont retrouvés dans la structure de trois grandes classes de protéines : les phosphodiesterases spécifiques et régulées par le GMPc (les PDEs des familles 5/6/10/11), les adénylyl cyclases provenant des cyanobactéries du genre *Anabaena*, et le facteur de transcription de la Formate hydrogenlyase Fhl A présent chez *E. coli* (citer GAF). Les PDE2s s'associent en homodimères (poids moléculaire de 103 kDa par monomère). C'est le domaine GAF A du segment N terminal qui permet la

dimérisation des PDE2s entre elles. L'on attribue parfois cette fonction à la fois aux domaines GAF A et GAF B (Heikans et al., 2009). Le domaine de régulation allostérique GAF B lie le GMPc (K_d : 10-30 μ M), et également l'AMPc, mais avec une affinité 30 fois inférieure. L'activité catalytique des PDE2s peut être augmentée jusqu'à 30 fois par la fixation du GMPc en concentrations physiologiques (1-5 μ M) au domaine GAF B (Keravis et Lugnier, 2012). L'AMPc peut aussi se fixer au domaine GAF B, mais son effet sur l'activation des PDE2s est moindre comparé à celui du GMPc. La PKC peut également phosphoryler la PDE2, et augmenter ainsi son activité catalytique (Geoffroy et al., 1999).

L'on retrouve la PDE2 exprimée dans plusieurs régions cérébrales comme l'hippocampe, le cortex, le bulbe olfactif ou le striatum (Stephenson et al., 2009, 2012; Kelly et al., 2014).

La PDE2A est une cible importante du GMPc dans le striatum, et son activation par le GMPc module efficacement l'intégration des signaux AMPc et PKA dans les MSNs (Polito et al., 2013). Il en est de même pour la modulation des réponses AMPc à la dopamine transitoire dans les MSNs D1 (travaux en cours chez souriceau, ainsi que chez la souris hémi-parkinsonienne, voir résultats Parkinson).

La PDE2 et sa modulation par le GMPc dans le striatum :

Le guanosine 3'-5' monophosphate cyclique (GMPc) joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques assurant la cognition, la mémoire, la régulation hémodynamique, la réponse immune, la fonction motrice, etc. Dans le striatum ce second messenger nucléotide cyclique est produit par les MSNs et les interneurons cholinergiques, suite à l'activation des guanylyl cyclases particulières (pGC) ou solubles (sGC). La pGC ne semble pas exprimée dans les neurones épineux du striatum (Herman et al., 1996), tandis que la sGC est fortement exprimée (Ding et al., 2004; Ariano et al., 1982), indiquant que la sGC activée par le NO est la principale source de GMPc dans le striatum. Le NO y est produit par les interneurons exprimant la NO synthase. Les élévations en GMPc faisant suite à l'activation des sGCs par le NO peuvent moduler plusieurs effecteurs comme les canaux CNGs, les protéines kinases GMPc-dépendantes (PKGs), et plusieurs PDEs, dont la PDE2A (Threlfell et West, 2013; Potter, 2011).

Le BAY-607550 (Boess et al., 2004) est un inhibiteur sélectif de la PDE2 (IC₅₀ de 2-5 nM), et l'inhibition de la PDE2 dans le cerveau est actuellement envisagée pour le traitement des troubles cognitifs (Blokland et al., 2006).

PDE4

La famille des PDE4s hydrolyse l'AMPc spécifiquement. Quatre gènes codent pour les PDEs de cette famille : PDE4A (chr 19p13.2), PDE4B (chrs 1p31), PDE4C (chrs 19p13.1) et PDE4D (chrs 5p12). Chacune possède plusieurs variants d'épissage alternatif. Plus de 25 isoformes de PDE4 ont ainsi été décrites chez l'homme, de poids moléculaire compris entre 50 et 125 kDa (Bolger et al., 2006). Les PDE4s se distinguent des autres PDEs par la présence de séquences uniques en partie N terminale, appelées UCR (*upstream conserved region*) 1 et UCR 2 (Bolger et al., 1993). Les isoformes longues de PDE4s expriment les deux séquences UCR 1 et UCR 2. Les isoformes courtes de PDE4s n'expriment pas la région UCR 1, et les isoformes super-courtes n'expriment qu'une moitié de la région UCR 2 (Houslay et al., 2007). La région UCR 1 contient un site de phosphorylation pour la PKA, qui une fois phosphorylé empêche l'interaction entre les régions UCR1 et UCR2, menant ainsi à une augmentation de l'activité catalytique (facteur 2) (Lim et al. 1999; Beard et al., 2000). Ce mécanisme de régulation par la PKA serait un feedback négatif pour atténuer et limiter les signaux AMPc. La partie C terminale du domaine catalytique des PDE4s, excepté pour la PDE4A, contient quant à elle un site de phosphorylation pour la kinase ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), qui une fois phosphorylé permet l'activation des isoformes courtes de PDE4s, et l'inhibition des isoformes longues (Baillie et al., 2000). Ce contrôle bidirectionnel des kinases PKA et ERK sur l'activité des PDE4 (isoformes longues) en font un noeud clé dans la communication inter-signaux intracellulaires : la phosphorylation simultanée des PDE4 par la PKA annule l'effet inhibiteur de ERK sur l'activité catalytique, et permet le retour à un état d'activité basal. Plus récemment, des régulateurs additionnels (Cdk5 et CaMKII) de l'activité PDE4 ont été décrits, et supportent l'idée que PDE4 joue un rôle central dans l'intégration des signaux AMPc/Ca²⁺ (Mika et Conti, 2016; Plattner et al., 2015). Les PDE4s, au même titre que les PDEs d'autres familles, existent sous forme de dimères. Les régions UCR permettent la dimérisation. Seules les isoformes longues de PDE4 contenant les séquences UCR1 et UCR2 peuvent dimériser (Richter et Conti, 2004). La localisation subcellulaire des PDE4s est déterminée par les AKAPs (*A kinase anchoring*

proteins), connues pour leur rôle dans l'ancrage de la PKA, principal effecteur de l'AMPC (Skroblin et al., 2010; Welch et al., 2010; Dodge et al., 2001). L'on retrouve les PDE4s exprimées un peu partout dans l'organisme, notamment dans le cerveau, les muscles lisses, le coeur, les reins, les cellules endothéliales et les lymphocytes (Lakics et al., 2010; Keravis et Lugnier, 2012; Kelly et al., 2014). La PDE4B est exprimée majoritairement dans le striatum et le noyau accumbens (Cherry et Davis, 1999).

La PDE4 joue un rôle important dans la régulation des réponses aux stimuli beta-adrénergiques et dopaminergiques dans les neurones du cortex sensoriel (Castro et al., 2010, 2013). Les souris PDE4D-KO ont un phénotype résistant à la dépression (Zhang et al., 2002), et les inhibiteurs de la PDE4 ont été envisagés pour le traitement de la dépression. Le rolipram est un inhibiteur spécifique de la PDE4 (Schwabe et al., 1976; Lugnier et al., 1986, 1993), très puissant et présentant des propriétés d'antidépresseur (Wachtel et Schneider, 1986). Mais son utilité en clinique est limitée par ses effets indésirables (nausées, vomissements). Les inhibiteurs de PDE4, comme le roflumilast (Hatzelmann et al., 2010), sont essentiellement utilisés dans le traitement de maladies inflammatoires et respiratoires (asthme, broncopneumopathies, arthrite), et concernant les autres applications en neuropsychiatrie, des inhibiteurs spécifiques et des modulateurs allostériques de la PDE4D sont envisagés comme procognitifs (Burgin et al., 2010). La schizophrénie est un autre exemple de pathologie où la PDE4 est ciblée, car la baisse des niveaux intracellulaires en AMPC est un endophénotype souvent décrit dans la schizophrénie (Garver et al., 1982; Muly, 2002). Plusieurs études ont démontré la capacité des inhibiteurs de PDE4 à produire des effets antipsychotiques. Chez le rat, le rolipram, annule - au même titre que les antipsychotiques classiques - les effets délétères de l'amphétamine chez un modèle animal de schizophrénie. (Maxwell et al., 2004). Il est également décrit pour la PDE4 une association avec la protéine adaptatrice DISC-1 (*disrupted in schizophrenia 1*) (Millar et al., 2005). DISC-1 interagit avec la PDE4B via son domaine UCR2, et les élévations en AMPC permettent la libération de PDE4B, et une augmentation de son activité phosphodiésterasique. La protéine DISC-1 est impliquée dans la régulation de la croissance neuronale et dans la migration, et est le premier facteur de risque génétique associé à la schizophrénie (Millar et al., 2005; Sawa et Snyder, 2005). De plus une anomalie du gène de PDE4B est retrouvée dans une famille de patients schizophréniques (Millar et al., 2005).

PDE7

La famille 7 des PDEs regroupe des PDEs spécialisées dans l'hydrolyse de l'AMPc, à affinité particulièrement élevée (K_m d'environ 0,2 μM , la plus petite valeur de K_m mesurée pour les PDEs dégradant l'AMPc dans le striatum)(Michaeli et al., 1993; Sasaki et al., 2002). Les PDE7s sont insensibles au rolipram (inhibiteur spécifique des PDE4s) et ne possèdent pas de séquences de régulation connues sur leur segment N terminal. Deux gènes codent pour les PDEs de cette famille, PDE7A (chrs 8q13) et PDE7B (chrs 6q23-q24). Il existe trois variants d'épissage pour la PDE7A : PDE7A1 (57 kDa), PDE7A2 (50 kDa), PDE7A3 (50 kDa), et quatre variants pour la PDE7B : PDE7B1, PDE7B2, PDE7B3 et un quatrième variant retrouvé sur Genbank. Les variants PDE7B1 et PDE7B3 présentent deux sites de phosphorylation par la PKA. L'ARNm des PDE7s est présent dans le cerveau ainsi que dans de nombreux tissus périphériques (Miro et al., 2001; Menniti et al., 2006; Kelly 2014). L'ARNm du gène PDE7B est particulièrement enrichi dans le cervelet, le thalamus, l'hippocampe et le striatum (Sasaki et al., 2002; Reyes-Irisarri et al., 2005; Kelly et al., 2014). Néanmoins la présence *in vivo* d'une activité enzymatique de PDE7B demeure floue, et la protéine ne semble être détectée dans le striatum. La transcription du variant PDE7B1 est augmentée par la stimulation des récepteurs D_1 dopaminergiques, via un mécanisme impliquant la signalisation AMPc/PKA/CREB (Sasaki et al., 2004). Dans un contexte où la signalisation AMPc/PKA serait alors anormalement augmentée dans les MSNs, comme par exemple dans la maladie de Parkinson (cf. hypersensibilité $D1$ /AMPc/PKA et uprégulation chronique des niveaux striataux en AMPc dans la maladie de Parkinson), il serait intéressant de voir comment la PDE7B1 réagit (transcrit/protéine), et si oui ou non cette dernière peut jouer un rôle dans la clinique de la maladie.

PDE8

La famille des PDE8 regroupe des PDEs spécialisées dans l'hydrolyse de l'AMPc. Leur affinité pour l'AMPc figure parmi les plus élevées, et les PDE8s sont insensibles au rolipram (inhibiteur spécifique des PDE4s), à l'IBMX (inhibiteur non spécifique des PDEs), et au GMPc (Vasta, 2006). Deux gènes codent pour les PDE8s : PDE8A (chrs 15q25.3) et PDE8B (chrs 5q13.3), qui possèdent chacun cinq variants d'épissage (Gamanuma et al., 2003). Pour certains variants, comme par exemple le variant PDE8A1, l'on retrouve en partie N terminale

des domaines REC et PAS : le domaine PAS permettrait la réalisation d'interactions protéine-protéine, ainsi que l'adressage subcellulaire (Soderling et Beavo, 2000). Trois sites de phosphorylation par la PKA et la protéine kinase G (PKG) sont également présents sur les PDE8s, compris entre le domaine PAS et le domaine catalytique (Keravis et Luginier, 2012). Le variant PDE8A2 ne possède pas de domaine PAS. Les variants PDE8A3, PDE8A4 tronqué et PDE8A5 tronqué ne possèdent ni domaine PAS ni domaine REC (Wang et al., 2001). Les variants PDE8B1 et PDE8B4 contiennent les deux domaines PAS et REC, mais les variants PDE8B2 et PDE8B3 présentent une délétion du domaine PAS. Le messenger des PDE8As est enrichi dans les testicules, et retrouvé dans les yeux, le foie, les muscles squelettiques, le coeur, les reins, les ovaires et le cerveau. La PDE8A présente un motif d'expression unique dans le cerveau : son messenger est retrouvé dans la substance blanche du cervelet, dans le corps calleux, la capsule interne, et la fimbria, laissant penser que le messenger subit un fort trafic axonal et/ou est exprimé dans les cellules gliales (Kelly et al., 2014). Le variant PDE8A1, le plus long (93 kDa), est le plus fréquemment exprimé. Le messenger des PDE8Bs est retrouvé dans le cerveau, particulièrement enrichi dans le gyrus dentelé et le striatum (Kobayashi et al., 2003; Kelly et al., 2014). La PDE8B1 est exprimée dans les glandes de la thyroïde, les PDE8B1 et PDE8B3 exprimées de façon égale dans le placenta. La PDE8B3 est le variant le plus abondant dans le cerveau (Hayashi et al., 2002). Une augmentation de l'ARNm des PDE8s est décrite dans l'hippocampe de patients Alzheimer (Perez-Torres et al., 2003).

PDE9

La famille 9 des PDEs regroupe des PDEs spécialisées dans l'hydrolyse du GMPc, codées à partir d'un gène unique, PDE9A (chrs 21q22.3)(Rentero et al., 2003), dont 21 variants ont été décrits. De toutes les PDEs, leur affinité pour le GMPc est la plus forte (Fischer et al., 1998), et les PDE9s sont insensibles jusqu'à des doses de 100 mM aux inhibiteurs-référence des autres PDEs, et notamment à l'IBMX. Le zaprinast, connu pour inhiber la PDE5, inhibe aussi la PDE9 mais avec une efficacité moindre (IC_{50} de 35 mM) (Fischer et al., 1998). Il n'existe pas de séquences de régulation connues pour les PDE9s (Bender et Beavo, 2006), ni site de phosphorylation documenté (Omori et Kotera, 2007). Seuls les variants PDE9A1 (nucléaire) et PDE9A6 (cytosolique) ont été caractérisés (Wang et al., 2003), retrouvés enrichis dans certains tissus du système immunitaire. L'ARNm des PDE9s est retrouvé de façon plus ou

moins ubiquitaire dans le cerveau, surtout enrichi dans le cervelet (Kelly et al., 2014; Lakics et al., 2010). Le messager PDE9A est également enrichi dans le striatum humain (Lakics et al., 2010), mais modérément dans le striatum rongeur (Kelly et al., 2014). Au cours de nos enregistrements, nous n'avons pas vu d'activité PDE9 dans le striatum. L'inhibiteur BAY 73-6691 inhibe la PDE9A avec une sélectivité 25 fois plus grande en comparaison à toutes les autres PDEs (Wunder et al., 2005) et possède des propriétés pro-cognitives (van der Staay et al., 2008). Le PF-04447943, inhibiteur de PDE9 capable de pénétrer dans le cerveau, augmente la plasticité synaptique dans les neurones de l'hippocampe, et la fonction cognitive chez le rongeur (Hutson et al., 2011).

PDE10

La famille des PDE10s rassemble des PDEs à double spécificité de substrat, codées par un gène unique : PDE10A (chromosome 6q26-27) (Fujishige et al., 1999, 2000; Bender et Beavo, 2006). Le gène PDE10A possède 18 variants d'épissage alternatif (PDE10A1-18). Le K_m de la PDE10A pour l'AMPc (0,25 μM) est plus bas que pour le GMPc (1,1 μM), et sa vitesse maximale d'hydrolyse du GMPc est 2 fois plus importante que celle de l'AMPc (Poppe et al., 2008). Pour ces raisons, l'hydrolyse du GMPc par la PDE10A est inhibée par l'AMPc (inhibition compétitive), phénomène de régulation croisée inverse à celui des PDE3s (Soderling et Beavo, 2000)(Bender et Beavo, 2006). La séquence protéique des PDE10s inclut deux domaines GAF en partie N terminale. Contrairement aux autres PDEs, le domaine GAF A des PDE10s ne semble lier que l'AMPc (Soderling et Beavo, 2000). La liaison de l'AMPc sur ce domaine GAF n'a pas ou peu d'effet sur l'activité phosphodiesterase (Matthiesen et Nielsen, 2009; Jager et al., 2012). La PDE10A est retrouvée essentiellement dans le cerveau, en particulier dans le striatum et le noyau accumbens, où son activité permet la régulation fine de l'expression génique (Seeger et al., 2003; Hebb et al., 2004; Nishi et al., 2008; Strick et al., 2010). La PDE10A est spécifique des neurones épineux striataux, essentiellement localisée dans la membrane des dendrites et épines, et n'est pas retrouvée dans les interneurons (Xie et al., 2006). Son expression est très conservée à travers les espèces (Kelly et al., 2014; Lakics et al., 2010). Le variant PDE10A2 est exprimé spécifiquement dans les neurones épineux du striatum, associé aux membranes, et sa localisation subcellulaire est influencée par la PKA : la PDE10A2 une fois phosphorylée devient cytosolique (Kotera et al., 2004). La papavérine, qui figure dans le tableau A de la

pharmacopée française, est l'inhibiteur historique de la PDE10, avec une EC_{50} de 36 nM (Siuciak et al., 2006a). Elle est issue du latex de pavot (*Papaver somniferum*), présente en faible teneur dans l'opium (0,01% des alcaloïdes totaux), et facilement obtenue par synthèse. Le TP-10 est inhibiteur puissant et spécifique de la PDE10 (Pfizer), qui a été testé en préclinique pour le traitement de la schizophrénie (Schmidt et al., 2008). Un autre inhibiteur spécifique, le MP-10, ainsi que la papavérine ont une action sur les symptômes négatifs de la schizophrénie (Grauer et al., 2009). Le MP-10 améliore les fonctions striatales et corticales dans un modèle murin de la maladie d'Huntington (Giampa et al., 2010), et l'on décrit pour la PDE10A un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (Giorgi et al., 2011). De nombreux autres inhibiteurs très sélectifs et à haute affinité ont été développés au cours des 15 dernières années par l'industrie pharmaceutique (Menniti et al., 2007; Chappie et al., 2009; Kehler et Nielsen, 2011). Les souris PDE10-KO présentent une activité locomotrice diminuée, et des réponses altérées aux psychostimulants. L'inhibition pharmacologique de la PDE10, qui résulte en une forte activation striatale (Polito et al., 2015), diminue les réponses d'évitement conditionné chez la souris, et mime ainsi les effets cliniques des antipsychotiques (Nishi et al., 2008; Strick et al., 2010). Cependant aucun inhibiteur de PDE10 ne s'est avéré efficace utilisé chez les patients schizophrènes.

Rôle des principales PDEs du striatum :

Le rôle et l'importance des PDEs ont pu être progressivement établis grâce aux études sur leur distribution dans différents types neuronaux et régions cérébrales, sur leur association à certains complexes macromoléculaires de signalisation, et sur les phénotypes associés à des mutations ou ablations de gènes de PDEs chez l'homme et autres modèles animaux (Kleppisch, 2009). Les inhibiteurs non sélectifs des PDEs tels que l'IBMX, et plus récemment avec des inhibiteurs sélectifs ont également été utilisés pour sonder les effets physiologiques des nucléotides cycliques et des PDEs dans différentes régions du cerveau, dont le striatum. Le striatum exprime l'ARNm des PDE1B, PDE2A, PDE4B, PDE7A/B, PDE8B et PDE10A (Heiman et al., 2008; Kelly et al., 2014; Stephenson et al. 2012). Les PDE1B, PDE2A et PDE10A dégradent à la fois l'AMPc et le GMPc, mais leur distribution subcellulaire dans les neurones épineux striataux, et leurs mécanismes de régulation respectifs, permet à chacune de jouer un rôle fonctionnel spécifique. Du point de vue de la localisation, la PDE10A est préférentiellement liée aux membranes alors que la PDE1B est

soluble (Xie et al., 2006). La PDE2A est à la fois soluble et présente aux membranes, où elle colocalise fortement avec les ACs de type V/VI et la PKA au niveau des rafts lipidiques (Noyama et Maekawa, 2002). La PDE4 semble être retrouvée dans plusieurs compartiments du neurone, et le mystère demeure pour les PDE7 et PDE8 dont les protéines ne sont pas retrouvées *in vivo*. Par ailleurs, l'AMPc n'étant lui même pas réparti de façon homogène au sein du neurone (Averaimo et Nicol, 2014; Neves, 2012), toutes les PDEs n'ont pas le même accès à ce dernier (Bacskai et al. 1993; Neves et al. 2008; Castro et al., 2010; Li et al., 2015).

Avec la localisation subcellulaire, les propriétés cinétiques (affinité, activité catalytique) des PDEs contribuent aussi à l'équilibre des signaux AMPc dans les neurones. Par exemple, une PDE exprimée faiblement mais dont l'affinité et l'activité catalytique sont importantes peut réguler de façon critique la dynamique des signaux AMPc. Dans les neurones les niveaux intracellulaires d'AMPc peuvent augmenter jusqu'à cent fois après la stimulation d'un récepteur métabotrope : au repos les concentrations moyennes en AMPc sont de l'ordre du nanomolaire, et l'activation des cyclases subséquente à la stimulation d'un RCPG élève ces concentrations jusqu'au micromolaire (Bacskai et al. 1993; Castro et al., 2010, 2013). Dans le striatum les PDEs spécialisées dans la dégradation de l'AMPc régulent différents niveaux d'AMPc (Figure 3) : la PDE de haute affinité (PDE10A), régule la production tonique en AMPc, ce qui a déjà été démontré par notre équipe (Polito et al., 2015). Les PDEs de basse affinité (PDE1B, PDE2A) dégraderaient les niveaux élevés d'AMPc, comme ceux produits à l'issue de la stimulation de récepteurs, contrôlant ainsi l'amplitude et la durée des signaux AMPc stimulés. De même, notre équipe a déjà montré que la PDE2A régule les niveaux élevés d'AMPc (Polito et al., 2013).

Fig. 1.1 PDEs enriched in MSNs display a wide range of affinities for cAMP. Michaelis Menten constant (K_m) for each PDE gene variant. Each box depicts the range of experimental K_m values reported in the literature for the various isoforms of each gene

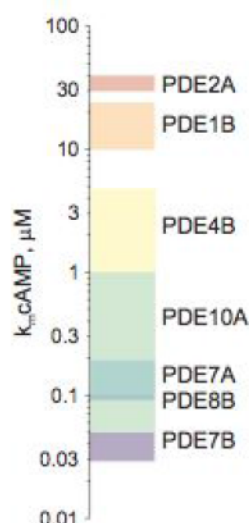


Figure 3 : Affinité pour l'AMPc - Constantes de Michaelis Menten (K_m) des PDEs enrichies dans les MSNs. Chaque boîte de couleur représente l'étendue des valeurs de K_m mesurées expérimentalement pour les différents isoformes de chaque gène de PDE. (D'après Neves-Zaph, 2017)

La contribution de chaque isoformes de PDEs striatales dans la dégradation de l'AMPc est par ailleurs fortement influencée par les niveaux de dopamine (DA) extracellulaire (Song et al., 2013) : à faible concentration en DA (DA tonique ~ 100 nM) la PDE10A contribue à plus de 80% de l'activité PDE totale (confirmé expérimentalement, (Russwurm et al. 2015)); lorsque la concentration en DA augmente (~ 1 μM) (e.g. suite à la prise de psychostimulants, d'un traitement à la L-DOPA, DA phasique, pathologie), les niveaux en AMPc intracellulaire dépassent le nanomolaire et approchent le micromolaire, et la contribution de la PDE4B dans l'hydrolyse de l'AMPc augmente; enfin à des concentrations saturantes en dopamine (e.g. 10 μM) les niveau en AMPc dépassent le micromolaire et c'est la PDE2A qui contribue majoritairement à la dégradation de l'AMPc (Figure 4).

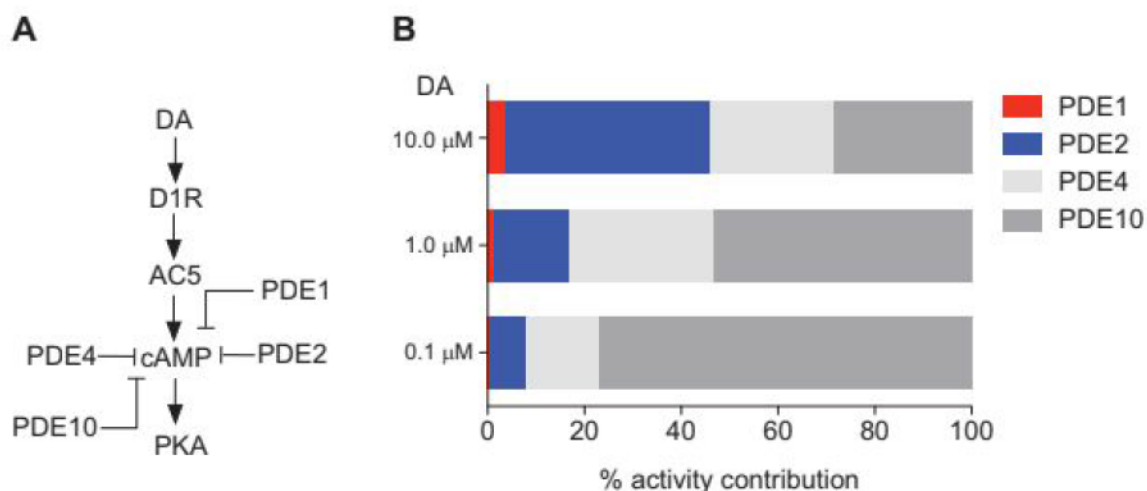


Figure 4 : La contribution des PDEs dans la régulation des niveaux d'AMPc varie suivant l'état cellulaire des MSNs.

A) Modèle de la signalisation AMPc/PKA en aval du récepteur D₁ dopaminergique dans les neurones épineux D1 striataux (d'après Song et al., 2013). La dopamine (DA) active le récepteur D₁ dopaminergique (D1R) couplé aux adénylyl cyclases de type V (AC5) via des protéines G stimulatrices, et augmente les niveaux d'AMPc, ainsi que l'activité PKA. L'AMPc y est dégradé par les phosphodiésterases PDE1B, PDE2A, PDE4B et PDE10A, et leur activité relative, influencée par les niveaux de dopamine DA extracellulaire, est représentée en (B) sous la forme de pourcentage de l'activité PDE totale. (D'après Neves-Zaph, 2017)

La distribution des PDEs dans le cerveau des rongeurs est assez semblable à celle que l'on retrouve chez l'homme (Lakics et al., 2010; Kelly et al., 2014), et chaque PDE présente un profil distinctif de distribution dans le cerveau, très conservé entre les espèces pour certaines PDEs comme par exemple les PDE2A et PDE4A-D (Kelly et al., 2014). Néanmoins dans plusieurs régions cérébrales comme le striatum, le cervelet, l'hippocampe ou le cortex, l'expression de certaines PDEs est amené à changer au cours du développement (Kelly et al., 2014). Dans le striatum en particulier, plusieurs isoformes de PDEs subissent des changements de transcription significatifs au cours du développement (Kelly et al., 2014) : les ARNm des PDE1C (+60%), PDE8A (+80%) et PDE11A (+40%) voient leur expression augmenter avec l'âge, alors que les messagers des PDE1A/B (-20/30%), PDE2A (-30%) et PDE4A (-20%) (la PDE4D dans un degré moindre) voient leur expression diminuer. Néanmoins comme cela a déjà été montré pour les PDE11A et PDE8A dans les neurones de l'hippocampe, même un changement fort des niveaux de l'ARNm ne corrèle pas toujours avec un changement au niveau de la protéine ou de l'activité. Chaque type de PDE présente

ainsi un mode de régulation, une localisation sub-cellulaire, une activité sélective sur différents niveaux de concentrations en nucléotide cycliques et des changements d'expression au cours de l'âge ou en fonction de situations pathologiques. Tous ces facteurs déterminent un profil unique de chaque PDE, et détermine l'effet *in vivo* des inhibiteurs spécifiques.

Des inhibiteurs de PDEs pour la cognition et la schizophrénie :

A forte concentration la caféine et méthylxanthines affiliées bloquent l'activité des PDEs, un effet pharmacologique qui pourrait contribuer aux actions de ces substances. Parce que les inhibiteurs de PDEs (iPDEs) non sélectifs sont associés à des effets indésirables décourageants, de nombreuses avancées ont été réalisées pour le développement d'iPDEs sélectifs : exemple du sildénafil (Viagra*), inhibiteur spécifique de la PDE5, prescrit dès 1998 dans le traitement de la dysfonction érectile, puis plus récemment utilisé pour soigner l'hypertension pulmonaire. D'autres inhibiteurs sélectifs de PDE5 ont été développés pour les mêmes indications : le tadalafil (Cialis*) et le vardenafil (Levitra*). Des progrès ont également été réalisés pour le développement d'inhibiteurs sélectifs de PDEs spécifiquement retrouvées dans le cerveau. Le rolipram par exemple inhibe toutes les isoformes de PDE4. Dans les débuts de son développement, le rolipram présentait des propriétés anti-dépressives prometteuses. Mais son utilité clinique apparut limitée par ses nombreux effets secondaires, notamment la nausée et les vomissements. Cependant la PDE4 présente de nombreux sous-types, et un inhibiteur sélectif de l'un de ces sous-types en particulier pourrait être un candidat-antidépresseur dépourvu des effets indésirables du rolipram. Au Japon, l'ibudilast, autre iPDE4 ciblant plusieurs isoformes de PDE4 est commercialisé en tant qu'anti-inflammatoire, et fait l'objet d'étude pour plusieurs indications en neuro-psychiatrie (Kodimuthali et al., 2008). Enfin le développement des iPDEs sélectifs aura aussi été marqué cette dernière décennie par les inhibiteurs sélectifs de la PDE10A, isoforme particulièrement enrichie dans les neurones épineux du striatum, et qui ont été envisagés pour le traitement de la schizophrénie.

Une indication souvent testée pour les iPDEs est le traitement des troubles cognitifs, associés au vieillissement et aux maladies neuro-psychiatriques. L'augmentation des niveaux intracellulaires en AMPc dans les neurones est en effet souvent associée à l'amélioration des fonctions cognitives (Arnsten et al., 2005; Baxter, 2003; Kelly, 2018), indiquant que

l'inhibition des PDEs pourrait être bénéfique en pathologie (Blokland et al., 2006; Schmidt, 2010). Cependant certains inhibiteurs pharmacologiques de PDEs peuvent aussi altérer la fonction cognitive, en particulier chez les individus âgés. De nombreuses études menées chez l'animal (souris génétiquement modifiées) démontrent l'effet du changement d'expression des PDEs sur les capacités cognitives : par exemple les souris PDE1B-KO et PDE10A-KO présentent des phénotypes complètement opposés (Siuciak et al., 2006b, 2007; Reed et al., 2002), alors qu'il s'agit là de deux PDEs à double spécificité de substrat. Cela résulte certainement des spécificités nombreuses de chaque PDE : même si ces PDEs sont similaires par leur action sur l'AMPc et le GMPc, elles diffèrent par les niveaux de nucléotides cycliques sur lesquels elles opèrent, par leur profil d'expression et par leur mode de régulation.

4. La Protéine kinase AMPc-dépendante (PKA)

Dans les neurones, la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) exerce aussi bien des effets rapides et transitoires (e.g. à la membrane) que des effets lents et durables (e.g. dans le noyau), critiques pour la régulation de fonctions telles que l'excitabilité ou la plasticité neuronale, la croissance axonale, et l'adaptation aux stimuli environnementaux (McKnight, 1991; Nagai et al., 2016; Gorshkov et al., 2017). La PKA est plus précisément une Sérine/Thréonine kinase, qui ne phosphoryle que les protéines-cibles exprimant des acides aminés Sérine (Ser, S) ou Thréonine (Thr, T) au sein de séquences consensus (Taylor et al., 1990, 2004). La PKA est constituée de deux sous-unités catalytiques, notées C, attachées à deux sous-unités régulatrices, notées R (Taylor et al., 1990). En l'absence d'AMPc, la PKA se présente sous forme d'hétérotétramère, noté R_2C_2 , et l'holoenzyme R_2C_2 (PKA à l'état inactif) est localisée dans des compartiments subcellulaires discrets, au sein de complexes multiprotéiques organisés par les protéines d'ancrage de la protéine kinase A (ou AKAPs, *A Kinase anchoring proteins*). Il existe trois isoformes de sous-unités C ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$) et quatre isoformes de sous-unités R ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$, $RII\beta$) (Taylor et al., 2004). L'isoforme $C\alpha$ est retrouvée dans tous les tissus de l'organisme, alors que $C\beta$ a une expression davantage tissu-spécifique (comme dans le cerveau par exemple). Il en est de même pour la $C\gamma$ retrouvée uniquement dans les testicules (Beebe et al., 1992). Les isoformes $RI\alpha$ et $RI\beta$ sont ubiquitaires. $RII\beta$ est la sous-unité R la plus exprimée dans les neurones (Cadd et McKnight,

1989). Dans le striatum, les isoformes PKA prédominants sont : $C\alpha$, $C\beta$ et $R_{II}\beta$ (Brandon et al., 1998). Lorsque l'AMPc se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA, les sous-unités catalytiques, dont le poids moléculaire est de 38 kDa, se détachent et diffusent de façon passive dans la cellule, et également à travers les pores de l'enveloppe nucléaire pour phosphoryler des cibles cytosoliques et nucléaires (Harootunian et al., 1993). Dans le compartiment nucléaire elles permettent l'activation de facteurs de transcription, et la phosphorylation de la protéine histone H3 (Stipanovich et al., 2008). Seules les sous-unités C libres peuvent entrer dans le noyau, car l'holoenzyme R_2C_2 est trop volumineuse pour passer les pores nucléaires (Harootunian et al., 1993).

Des études portant sur les cinétiques de l'activité PKA dans les systèmes biologiques ont montré qu'une fois activée par l'AMPc, la PKA prenait quelques secondes pour phosphoryler ses cibles à la membrane, 2-3 minutes pour ses cibles cytosoliques, et plus de dix minutes pour phosphoryler ses cibles nucléaires (voir Gervasi et al., 2007). Mais de façon intéressante, en utilisant l'imagerie de biosenseurs adressés au noyau, notre équipe a montré que dans le striatum, les signaux PKA nucléaires avaient une cinétique beaucoup plus rapide (voir article 2).

La famille des protéines AKAPs (*A kinase anchoring proteins*) rassemble une cinquantaine de membres dont la fonction est de localiser la PKA à proximité de ses substrats (compartimentation spatiale du signal). Les AKAPs interagissent avec la PKA via ses sous-unités R, et peuvent aussi lier d'autres protéines de la signalisation intracellulaire, comme les cyclases, les phosphodiesterases, ou les phosphatases (Tasken et Aandahl, 2004; Wong et Scott, 2004). La protéine AKAP5 (synonymes AKAP75/79/150) est la principale AKAP retrouvée dans les neurones (Carnegie et Scott, 2003).

5. Les autres effecteurs de l'AMPc

Dans les cellules eucaryotes, la multitude des fonctions régulées par l'AMPc implique la protéine kinase AMPc-dépendante, mais aussi d'autres effecteurs : les canaux ioniques dits sensibles aux nucléotides cycliques (CNG, HCN) et les protéines Epac (Beavo et Brunton, 2002). Néanmoins dans les neurones épineux moyens striataux, le rôle de ces effecteurs de l'AMPc reste encore peu connu.

Les canaux sensibles aux nucléotides cycliques sont perméables au calcium et aux cations monovalents de façon non sélective (K^+/Na^+). Ils interviennent dans la régulation du potentiel de membrane cellulaire (Craven et Zagotta, 2006). Les canaux CNG (*cyclic nucleotide gated channels*) s'organisent en tétramères constitués de deux sous-unités homologues A et deux sous-unités B (Kaupp et Seifert, 2002). La fixation d'une molécule d'AMPc ou de GMPc sur chaque sous-unité permet l'ouverture des canaux CNG (ouverture maximale lorsque les quatre sous-unités ont fixé un nucléotide cyclique). Leur ouverture permet la dépolarisation des cellules et un influx massif de calcium. Le calcium entrant par les canaux CNG peut alors se lier à la calmoduline (CaM) pour moduler l'activité de nombreux effecteurs. Les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) quant à eux, dont quatre isotypes sont retrouvés chez le mammifère, s'ouvrent en réponse à une hyperpolarisation de la cellule et se ferment lors de la propagation de potentiels d'action. Ils permettent ainsi la génération de courants cationiques dépolarisants lents, aussi connus sous les noms de courants I_h , I_f , et I_q (Herrmann et al., 2015). L'AMPc ou le GMPc en se liant aux canaux HCN augmentent leur activité. Dans le domaine des neurosciences les canaux HCN sont surtout étudiés pour leur implication dans les douleurs neuropathiques et dans l'épilepsie (Herrmann et al., 2015; DiFrancesco et DiFrancesco, 2015).

Enfin les protéines Epac (*exchange proteins directly activated by cAMP*) ont été découvertes en 1998, décrites très conservées dans l'évolution et ubiquitaires. Dans la cellule, les protéines Epac catalysent l'échange du GDP par du GTP, en faveur des petites GTPases que sont les protéines Rap 1 et Rap 2 (*Ras related proteins*) inactives lorsque associées au GDP (Gloerich et Bos, 2010). Il existe deux isoformes de protéines Epac : Epac1 et Epac2, de structures similaires. Leur segment N terminal constitue un domaine de régulation, et leur segment C terminal porte l'activité catalytique. Epac1 est adressée aux membranes via un domaine DEP (Disheveled, Egl-10, Pleckstrin) situé en région N terminale. Sa structure renferme aussi un domaine de liaison à l'AMPc, de séquence similaire aux domaines de liaison des nucléotides cycliques retrouvés sur les canaux CNG ou sur la sous-unité régulatrice de la PKA. En région C terminale l'on retrouve un domaine REM (*Ras exchange motif*) juxtaposé au domaine catalytique, qui permet de stabiliser le domaine d'échange du GDP. Epac2 présente la même organisation structurale que Epac1, mais s'en distingue par la présence d'un domaine de liaison à l'AMPc supplémentaire. En condition basale, le domaine

catalytique des protéines Epac est inhibé par le domaine de liaison à l'AMPc. Suite à la fixation d'AMPc, Epac change de conformation, démasque son domaine catalytique, et active alors les protéines Rap. Dans les neurones les protéines Epac régulent l'exocytose, l'excitabilité, la croissance, ou encore de la différenciation neuronale (Gloerich et Bos, 2010; Laurent et al., 2012).

6. Les Phosphatases

Les réactions de phosphorylation orchestrées par les protéines kinases à l'instar de la PKA sont "défaites" par l'action de protéines appelées les phosphatases (Walaas et al., 2011).

L'équilibre entre ces deux activités enzymatiques, et la phosphorylation réversible des protéines-cibles qui en découle, constituent un aspect majeur de la signalisation intracellulaire dans nos cellules. Chez les eucaryotes, trois résidus aminés au sein d'une séquence consensus font l'objet de phosphorylations : la sérine (Ser, ou S), la thréonine (Thr, ou T), et la tyrosine (Tyr, ou Y). Les phosphosérines (pS) représentent la grande majorité (86,4%) des phosphoaminoacides phosphorylés (Olsen et al., 2006). Les phosphatases se spécialisent dans la déphosphorylation d'un ou de deux acides aminés (exemple des Tyr phosphatases et des Ser/Thr phosphatases)(Cohen, 1989). Il n'existe qu'une trentaine de Ser/Thr phosphatases, qui pourtant déphosphorylent de façon spécifique des milliers de substrats différents. Les Sérine/Thréonine phosphatases sont ubiquitaires chez les eucaryotes, et se scindent en trois grandes familles (Shi, 2009), caractérisées par leur séquence/structure, et leur préférence de substrat : les phosphoprotéines phosphatases (PPPs), les phosphatases dépendant des métaux (PPMs, PP2C), et les phosphatases dépendant de l'aspartate. Les PPPs rassemblent les protéines phosphatases 1 (PP1), PP2A, PP2B (ou PP3, également appelée calcineurine), PP4, PP5, PP6 et PP7. Les PPPs présentent trois motifs-signatures dans leur séquence (-GDXHG-, -GDXVDRG- et -GNHE-), inclus au sein de leur domaine catalytique d'environ 280 acides aminés. Protéines multimériques, les PPPs sont assez conservées à travers les différents règnes du vivant (plantes, champignons, animaux) ainsi que chez certaines bactéries (Moorhead et al., 2009), et sont classiquement constituées d'une sous-unité catalytique, associée à une ou plusieurs sous-unités régulatrices. Les fonctions des sous-unités régulatrices sont multiples : assurer la spécificité de substrat, réguler l'activité

catalytique, définir la localisation subcellulaire, etc. Les phosphatases PPMs quant à elles sont monomériques et ne possèdent pas de sous-unités régulatrices.

Dans le striatum, les phosphatases essentiellement retrouvées sont les phosphatases PP1, PP2A et PP2B.

Phosphatase PP1

Il existe trois gènes codant pour trois isoformes de la protéine phosphatase PP1 : PP1 α , PP1 β et PP1 γ , présentant plusieurs variants d'épissage (da Cruz e Silva et al., 1995; Herzig et Neumann, 2000). Les différentes sous-unités catalytiques de PP1 peuvent être associées à différentes sous-unités régulatrices, donnant lieu à une diversité d'isotypes se caractérisant par leur localisation subcellulaire, leur spécificité de substrats, et leur activité pharmacologique. Retrouvée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Ouimet et al., 1995), la PP1 est la principale PP striatale. Son activité catalytique est bloquée par les sous-unités régulatrices telles que l'inhibiteur 1 (PP1R1A) et la protéine DARPP-32 (PP1R1B) (Oliver et Shenolikar, 1998; Hemmings et al., 1984).

Phosphatase PP2A

La phosphatase PP2A se compose d'une sous-unité catalytique, associée à une première sous-unité régulatrice constante, notée A, pouvant s'associer à plusieurs autres sous-unités régulatrices B dites variables (Herzig et Neumann, 2000). Plusieurs isoenzymes PP2A sont retrouvés dans le striatum. Il existe deux isoformes (α et β) pour les sous-unités catalytique et régulatrice constante, codées par deux gènes différents (Khew-Goodall et al., 1991). C'est la sous-unité régulatrice constante qui recrute les régulatrices variables, déterminant ainsi la fonctionnalité de l'enzyme. PP2A est majoritairement cytosolique, mais possède certaines isoenzymes nucléaires. La sous-unité régulatrice variable B56 δ est activée via phosphorylation PKA-dépendante (Ahn et al., 2007).

Phosphatase PP2B

La PP2B, ou calcineurine, est activée par le complexe Ca²⁺/calmoduline, et est très exprimée dans le cerveau (Shi, 2009). Localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Heineke et Ritter, 2012), la PP2B se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une

sous-unité catalytique (CnA) et d'une sous-unité régulatrice (CnB) pouvant lier la calmoduline. Trois gènes codent pour trois isoformes distincts de sous-unités catalytiques : CnA α , CnA β , CnA γ ; et deux gènes codent pour deux isoformes de sous-unités régulatrices : CnB α et CnB β . Plusieurs variants d'épissage sont décrits pour ces différentes isoformes, à expression ubiquitaire. Dans le cerveau les sous-unités CnA α 1 et CnA β 2 sont particulièrement exprimées (Ueki et al., 1992).

7. DARPP-32 : 3ème messenger spécifique du striatum

Dans les neurones épineux striataux la dynamique des effets intracellulaires des médiateurs qui modulent l'AMPc et l'activité PKA (e.g. dopamine agissant sur les récepteurs D₁) est amplifiée par la protéine DARPP-32 (*Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa*)(Fiendeberg et al., 1998; Ouimet et al., 1984, 1998). DARPP-32 figure parmi les substrats de la PKA les plus étudiés ces dernières décennies, notamment pour son rôle clé dans la régulation de l'activité phosphatase PP-1, et son importance dans l'intégration des signaux dopaminergiques et glutamatergiques (Hemmings et al., 1984; Greengard, 2001; Fernandez et al., 2006).

La protéine DARPP-32 est codée par un gène unique (PPP1R1B;chromosome 17q12, 9 exons) et est présente chez les mammifères (primates, rongeurs, bovins), la drosophile, ou encore le vers *C. elegans*. Sa séquence protéique (longue de 202 acides aminés) présente 100% d'homologie entre les variants homme/gorille, et jusqu'à 90% d'homologie avec les autres singes. Deux isoformes de DARPP-32 sont produits par épissage alternatif, l'isoforme 1 et un variant tronqué auquel il manque entre 1 et 36 acides aminés (Yger et Girault, 2011). Le résidu Thréonine 34 (T34) de la protéine DARPP-32 est essentiellement phosphorylé par la PKA (Walaas et al., 1983), secondairement par la PKG (Greengard, 2001; Nishi et al., 2005; Threlfell et West, 2013). Cette phosphorylation fait alors de DARPP-32 un puissant inhibiteur de l'activité phosphatase PP-1, dont l'IC₅₀ est de l'ordre du nanomolaire (Hemmings et al., 1984; Snyder et al., 1998). La Thréonine 34 est déphosphorylée par deux phosphatases, la calcineurine (ou PP2B) activée par le complexe Ca²⁺/calmoduline, et la PP2A. DARPP-32 est également phosphorylée sur son résidu Thréonine 75 suite à l'activation des récepteurs D₁ (Nishi et al., 2000) par la kinase CDK5 (cyclin-dependent

protein kinase 5) activée par la sous-unité p35 dans les neurones, devenant alors un inhibiteur de la PKA (Bibb et al., 1999). DARPP-32 est aussi phosphorylée par les caséine kinases 1 et 2 (CK1 et CK2) (Desdouits et al., 1995a, b; Girault et al., 1989) : la CK1 phosphoryle le résidu Ser-130 (souris) ou Ser-137 (rat), ce qui a pour conséquence l'inhibition de la déphosphorylation du résidu pT34 par la calcineurine, et la CK2 phosphoryle les résidus Ser-45 et Ser-97 (Ser-102 chez le rat). La phosphorylation de ces résidus par la CK2 pourrait faciliter la phosphorylation du résidu T34 par la PKA, comme cela a déjà été décrit *in vitro*. Néanmoins le rôle le plus connu de la Ser-97 est la régulation des échanges cyto-nucléaires de DARPP-32 (Stipanovich et al., 2008) : la phosphorylation de la serine 97, déphosphorylée par la phosphatase PP2A (Bibb et al., 1999; Girault et al., 1989), facilite l'export nucléaire (Stipanovich et al., 2008). L'activation de la voie AMPc/PKA augmente la concentration intranucléaire de DARPP-32 dans les MSNs (Li et al., 2015), via activation de la déphosphorylation de la Ser-97 par PP2A.

Les rôles que DARPP-32 joue en physiologie et en pathologie sont discutés dans plusieurs revues (Sveningsson et al., 2004; Greengard et al., 1999; Yger et Girault, 2011; Girault, 2012; Wang et al., 2017). Un grand nombre de neuromédiateurs, comme la dopamine ou le glutamate, de médicaments, drogues d'abus ou psychostimulants (Borgkvist et Fisone, 2007; Sun et al., 2007; Bateup et al., 2008) régulent les états de phosphorylation de DARPP-32, et affectent ainsi les dynamiques de transduction, la plasticité synaptique et la fonction des MSNs.

8. Les récepteurs D₁- et D₂-like dopaminergiques

La dopamine agit sur les cellules et neurones qu'elle cible en se fixant à des récepteurs dédiés, les récepteurs dopaminergiques (*dopamine receptors, DARs*), dont cinq sous-types ont été décrits chez les mammifères (Missale et al., 1998; Beaulieu et Gainetdinov, 2011; Beaulieu et al., 2015). Ces derniers sont regroupés dans deux familles : la famille des récepteurs D₁-like (sous-type D₁ et D₅) et la famille des récepteurs D₂-like (sous-types D₂, D₃ et D₄). Dans le cerveau les DARs régulent de nombreuses fonctions, comme le mouvement et la locomotion, la motivation, ou encore la mémoire de travail, et des implications pour les cinq sous-types de DARs sont décrites dans de multiples pathologies de la neurotransmission

dopaminergique, telles la maladie de Parkinson, la schizophrénie, ou encore les addictions (Bordet, 2004). Au niveau périphérique, les DARs sont aussi décrits impliqués dans les fonctions immunologique, cardiovasculaire, rénale et gastro-intestinale.

Ainsi les DARs, en modulant l'activité des ACs, exercent par la voie canonique AMPc un contrôle sur l'activité PKA (Svenningsson et al., 2004; Beaulieu et Gainetdinov, 2011), et régulent la fonction de nombreuses cibles cellulaires incluant des canaux et récepteurs membranaires, ainsi que des protéines cytosoliques et nucléaires (Figure 5).

Figure 5 : Implication des récepteurs à la dopamine et de la signalisation AMPc/PKA dans la modulation des synapses corticostriatales (D'après Threlfell et West, 2013)

Les sous-types D_1 et D_2 , très présents au niveau du corps cellulaire, arbre dendritique et épines des MSNs (Uchigashima et al., 2016), sont les principaux DARs retrouvés dans le striatum (Le Moine et Bloch, 1995). Le sous-type D_5 est retrouvé en faible quantité à la fois dans le striatum dorsal et ventral (Rivera et al., 2002), alors que le sous-type D_3 n'est retrouvé que faiblement exprimé dans le striatum ventral (Levesque et al., 1992). Il fait actuellement l'objet de recherche pour le traitement de la schizophrénie et pourrait potentiellement jouer un rôle dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson (Sokoloff et Le Foll, 2017). Le sous-type D_4 n'est pas aussi fortement exprimé que les autres DARs mais est détectable dans le striatum (Ariano et al., 1997). L'expression des récepteurs D_1 et D_2 est fortement ségrégée entre les MSNs des voies directe et indirecte (cf. chapitre 1)(Lemoine et Bloch, 1995; Bertran-Gonzalez et al., 2008; Valjent et al., 2009; Gerfen et al., 1990), et seuls 2-5% des MSNs du striatum dorsal co-expriment les récepteurs D_1 et D_2 , contre 7-15% dans le striatum ventral (Valjent et al., 2009; Gagnon et al., 2017). Dans d'autres régions cérébrales comme le cortex par exemple, les deux sous-types de DARs sont retrouvés exprimés dans les mêmes cellules.

Pharmacologie du récepteur D_1

Le récepteur D_1 (D_1R) est le DAR le plus exprimé dans l'organisme, et est retrouvé dans le caudé putamen, l'accumbens, la substance noire, l'hypothalamus, le cortex frontal et le bulbe olfactif. Il est impliqué dans fonctions cognitives et motrices, mais aussi dans la physiopathologie des addictions aux drogues d'abus, de la maladie de Parkinson et de la schizophrénie. Le D_1R est codé par le gène *DRD1* (localisation chromosomique : 5q35.1) et est le premier récepteur dopaminergique découvert et caractérisé au sein de sa famille. Sa structure se distingue de celle des récepteurs de la famille D_2 -like par sa longue extrémité C terminale et une troisième boucle intracellulaire (ICL3) courte. De toutes les invalidations génétiques réalisées sur les DARs individuels, l'invalidation du gène *DRD1* chez la souris est celle qui conduit aux phénotypes les plus délétères (déficit de l'apprentissage, hyperactivité, troubles de la mémoire, etc.). Le D_1R est palmytoylé sur ses résidus Cys347 et Cys351 à proximité de l'extrémité C terminale : une réaction réversible décrite impliquée dans l'adressage aux membranes et le trafficking (Torrecilla et Tobin, 2006). Le D_1R est également glycosylé sur ses résidus Asn5 et Asn175, la N-glycosylation étant également une

réaction décrite impliquée dans l'adressage des RCPGs aux membranes. Cependant les inhibitions chimiques ou mutationnelles de la glycosylation du D₁R n'ont pas d'effet son adressage aux membranes, alors qu'elles perturbent de façon critique l'adressage du D₅R et sa fixation aux ligands. De nombreuses études utilisant des approches mutationnelles et pharmacologiques ont été menées pour corréler les spécificités structurales des DARs à leur fonction : par exemple des études utilisant des chimères D₁R/D₅R montrent que l'extrémité C terminale du D₁R possède à la fois une affinité pour la dopamine plus faible et une activité constitutive plus réduite en comparaison au sous-type D₅R. Cette particularité est attribuée à des différences/hétérologies de la troisième boucle extracellulaire (ECL3). La poche de fixation aux ligands catécholamines est constituée par les domaines transmembranaires 3,5 et 6. Le polymorphisme S199A affectant le domaine transmembranaire 5 diminue l'affinité du récepteur pour son antagoniste le SCH-23390. Le D₁R interagit avec de nombreuses autres protéines pour former des superstructures de signalisation incluant d'autres RCPGs, comme par exemple avec le récepteur D₂ (Lee et al., 2004), bien que l'existence de l'hétérodimère D₁/D₂ *in vivo* soit controversée, ou avec le récepteur à l'adénosine A₁ (Gines et al., 2000; Perreault et al., 2014; Beaulieu et Gaietdinov, 2015). Ainsi dans les neurones épineux D1 striataux la dopamine augmente directement les phosphorylations PKA-dépendantes tout en limitant l'activité de la phosphatase PP1 via la boucle de signalisation AMPc/PKA/DARPP-32. Ces deux effets combinés de la dopamine sur la régulation des niveaux de phosphorylation dans la cellule lui permettent de moduler efficacement la fonction de nombreux récepteurs, enzymes, canaux ioniques et facteurs de transcription (Neve et al., 2004; Svenningsson et al., 2004).

Régulation du D₁R

Après activation par un agoniste, les RCPGs subissent des phénomènes de désensibilisation permettant de diminuer leurs réponses vis-à-vis de stimulations continues. La désensibilisation résulte d'une première étape de phosphorylation (homologue ou hétérologue) des RCPGs par les protéines GRKs (*G protein-coupled receptor kinases*) ou les protéines kinases A et C. Le modèle général de désensibilisation implique aussi les arrestines, qui se fixent aux RCPGs après qu'ils aient été phosphorylés, empêchant alors leur couplage avec les protéines G et stoppant ainsi la production de seconds messagers. Le complexe RCPG/arrestine est alors internalisé via des puits recouverts de clathrine. Enfin le récepteur

est soit déphosphorylé par des phosphatases, les protéines GRPs (*G protein-coupled receptor phosphatases*) ou la PP2A, dans les vésicules d'endocytose et recyclé à la membrane prêt à transduire à nouveau (resensibilisation), ou soit adressé aux vésicules lysosomales en vue d'être dégradé. Néanmoins aux côtés de ce schéma général chaque RCPG possède des modes de régulation uniques. Les processus de désensibilisation du D₁R, ont été étudiés dans différents systèmes (sections de tissus, cultures primaires, cultures cellulaires exprimant le D₁R endogène, lignées cellulaires exprimant de façon stable ou transitoire un D₁R hétérologue. Gardner et collègues montrent que la dopamine induit la phosphorylation du D₁R avec une EC₅₀ de ~ 200 nM, identique à celle permettant d'induire sa désensibilisation. La phosphorylation a lieu en l'espace de quelques minutes ($t_{1/2} < 1$ min), et précède la désensibilisation ($t_{1/2} \sim 7$ minutes). Enfin la déphosphorylation du D₁R est plus rapide ($t_{1/2} \sim 10$ mins) que sa resensibilisation ($t_{1/2} \sim 3$ heures) (Gardner et al., 2001). Ni la concavalline A ou le sucrose hypertonique (inhibiteurs de l'internalisation), ni l'acide okadaïque ou la calyculine A (inhibiteurs de phosphatases) n'empêchent la déphosphorylation du D₁R, alors que le modèle général indique que les RCPGs sont internalisés dans leur état phosphorylés avant d'être secondairement déphosphorylés par les phosphatases GRPs/PP2A, sensibles aux inhibiteurs mentionnés précédemment. La phosphorylation du D₁R est assurée par les GRKs (GRKs2/3/5) (Tiberi et al., 1996) et par la PKA, qui phosphorylent des résidus Ser et Thr spécifiques dans les domaines intracellulaires du D₁R. Notamment le résidu Thr268 de la troisième boucle intracellulaire ICL3 (un des quatre sites de phosphorylation par la PKA) est important pour la vitesse de désensibilisation et le trafficking. La GRK4 α est impliquée dans la désensibilisation constitutive du D₁R (en l'absence de stimulation du récepteur par un agoniste), et phosphoryle les résidus Thr428 et Ser431 de l'extrémité C terminale du récepteur (Rankin et al., 2006). Peu d'infos concernant le rôle *in vivo* de la PKC dans la phosphorylation du D₁R alors que plusieurs sites de phosphorylation consensus sont retrouvés sur les régions cytoplasmiques du récepteur. Enfin l'endocytose du D₁R est permise par deux mécanismes impliquant soit la voie des puits recouverts de clathrine, soit la voie cavéoline. Les régions spécifiques du récepteur impliquées dans l'endocytose restent encore indéfinies à cause de données contradictoires. Le mécanisme initiant l'une ou l'autre des deux voies d'endocytose est également indéfini, et est certainement fortement influencé par l'environnement cellulaire.

Pharmacologie du récepteur D₂

Le gène codant pour le récepteur D₂ (D₂R) (DRD2, localisation chromosomique : 11q22-q23) possède huit exons (Gandelman et al., 1991). Il en existe deux variants d'épissage : un isoforme court noté D₂S (D₂ short) et un isoforme long noté D₂L (D₂ long) (Monsma et al., 1989). L'isoforme D₂L possède 29 acides aminés supplémentaires au niveau de la boucle ICL3 (Monsma et al., 1989) et est préférentiellement exprimé au niveau postsynaptique, à l'opposé du variant D₂S qui est exprimé préférentiellement au niveau présynaptique (Usiello et al., 2000). L'isoforme D₂L prédomine sur l'isoforme court dans le cerveau (Picetti et al., 1997). Au sein de la famille D₂-like le sous-type D₃R est l'homologue le plus proche du D₂R avec près de 75% d'homologie de séquence entre leurs domaines transmembranaires (Sokoloff et al., 1990). Le messenger du D₂R est enrichi dans le striatum, et le récepteur est retrouvé dans les MSNs ainsi que dans le péricaryon, les dendrites et les terminaisons axonales des neurones de la substance noire (Levey et al., 1993). Comme le D₁R, le D₂R subit beaucoup de modifications post-traductionnelles : trois sites consensus pour la glycosylation sont retrouvés au niveau de l'extrémité N terminale (Asn5, Asn17, Asn23), ainsi que de nombreux sites de phosphorylation importants pour la régulation. Comme nombre de RCPGs de la famille A/rhodopsine, le D₂R possède un motif DRY à la fin du troisième domaine transmembranaire, connu pour limiter l'activité constitutive des RCPGs. Le récepteur D₂ peut également dimériser avec d'autres récepteurs, notamment dans le striatum avec le récepteur à l'adénosine A_{2A}. Enfin du point de vue de la signalisation les premiers effets décrits de la stimulation du D₂R sont l'inhibition de la production d'AMPc (Stoof et Keibian, 1981). Ces effets sont bloqués par la toxine pertussique, qui cible les protéines inhibitrices G_{i/o}.

Régulation du D₂R

La protéine RGS9 (regulator of G signaling) colocalise avec le D₂R dans le striatum (Kovoor et al., 2005). Elle limite les signaux G_{i/o}-dépendants activés par le D₂R. Le D₂R est également sujet aux phénomènes de désensibilisation : la PKC phosphoryle le D₂R et diminue sa capacité à inhiber la production d'AMPc, comme les GRKs en particulier la GRK2 (Ito et al., 1999) phosphorylent le D₂R pour empêcher tout couplage avec les protéines G. Le recrutement de protéines accessoires incluant les arrestines ou la clathrine initie ensuite les

processus d'internalisation/recyclage-resensibilisation/dégradation, de façon similaire au récepteur D₁ (Tobin, 2008 pour revue).

Voies de signalisation non canoniques

En plus de moduler la voie canonique AMPc/PKA, la dopamine semble aussi moduler des voies de signalisation alternatives, rendant l'intégration de ses signaux neuromodulateurs encore plus complexe qu'initialement envisagée. Par exemple certaines réponses comportementales et fonctions médiées par la dopamine sollicitent l'activation de canaux ioniques, récepteurs à activité tyrosine kinase, le BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), l'IP3 (inositol triphosphate), ou encore la voie β -arrestine 2/Akt/GSK3 (voir revue Beaulieu et al., 2015).

Effets différentiels des stimulations phasique et tonique sur les récepteurs D₁ et D₂

Les récepteurs D₁ et D₂ voient leur état d'affinité pour la dopamine modulé par leur couplage aux protéines G : un état de haute affinité et un état de basse affinité, correspondant respectivement aux états pré-couplés ou non-couplés aux protéines G (Skinbjerg et al., 2012). Or des mesures de FRET indiquent que les protéines G inhibitrices de type G_{i/o} ont tendance à facilement se pré-coupler au RCPGs, D₂R compris, contrairement aux protéines G_s (Nobles et al., 2005). Ainsi différentes valeurs d'affinités pour les récepteurs D₁ et D₂ (Kd) ont été mesurées par des approches classiques de binding avec ligands radiomarqués, et estimées entre le nano- et le micromolaire (Seeman et al., 1980, 1987; Cumming, 2011). Dans le striatum, une fraction importante des récepteurs D₂ demeurerait dans un état basal de haute affinité (Kd : 10 nM)(Laruelle et al., 1997), et les récepteurs D₁ seraient prédominants à l'état de basse affinité (Kd : 1 μ M)(Ritchfield et al., 1989). Ainsi les niveaux tonique de DA (10-20 nM) seraient suffisant pour activer les récepteurs D₂ et bloquer la voie indirecte (Svenningsson et al., 1999), alors que les récepteurs D₁ seraient activés, en même temps que la voie directe, par les élévations phasiques du niveau de DA (Gerfen et al., 1990; Cumming 2011).

Autres RCPGs retrouvés dans le striatum

De nombreux médiateurs sont présents dans le striatum et peuvent moduler la signalisation AMPc/PKA dans les MSNs (revue Samadi et al., 2007). L'adénosine est un exemple,

produite par les neurones et cellules gliales après métabolisme de l'ATP (Ferre et al., 2008). L'adénosine se lie aux récepteurs A_{2A} des MSNs de type D2, positivement couplés à la cascade AMPc/PKA via la protéine G_{olf} (Corvol et al., 2001). Le récepteur A_{2A} est exprimé de façon sélective par les MSNs de type D2 (Valjent et al., 2009). L'adénosine peut aussi agir sur les MSNs de type D1 en se liant aux récepteurs A_1 , négativement couplés à la cascade de signalisation AMPc/PKA. De nombreuses études ont montré que l'adénosine et la dopamine exercent des effets opposés sur les sorties des ganglions de la base. Par exemple, les agonistes des récepteurs à l'adénosine suppriment les réponses motrices, alors que les antagonistes induisent une activation motrice (Ferre et al., 1997). L'existence d'hétérodimères entre les deux familles de récepteurs a été rapportée : pour les complexes A_1/D_1 (Gines et al., 2000) et A_{2A}/D_2 (Canals et al., 2003; Fuxe et al., 2003; Bonaventura et al., 2015), en utilisant différentes approches biophysiques. Dans des cellules transfectées l'activation des récepteurs A_1 ou A_{2A} au sein de ces deux types de complexes peut antagoniser les réponses AMPc suivant la stimulation des récepteurs D_1 ou D_2 respectivement (Ferre et al., 1991; Gines et al., 2000).

L'acétylcholine est un autre médiateur d'intérêt dans le striatum. Elle est libérée de façon tonique par les interneurons cholinergiques du striatum, et agit sur les récepteurs de type M_4 portés par les MSNs de type D1. Ces récepteurs sont couplés négativement à la signalisation AMPc/PKA via des protéines $G_{i/o}$, et la dualité entre les signalisations par l'acétylcholine et la dopamine dans les MSNs de type D1 est critique dans les processus d'apprentissage par renforcement (voir Nair et al., 2015).

D'autres médiateurs qui se lient aux RCPGs dans le striatum sont par exemple la sérotonine, les peptides opioïdes, les endocannabinoïdes, et le GABA (voir Samadi et al., 2007; Lovinger, 2010 pour revues). De façon intéressante, les RCPGs orphelins (RCPG88, RCPG6, RCPG52) sont aussi retrouvés dans le striatum, et leur intérêt est étudié pour des maladies comme la schizophrénie (Komatsu, 2015).

Objectifs

Les objectifs généraux de la thèse étaient de caractériser dans les neurones épineux du striatum la dynamique d'intégration des signaux neuromodulateurs, en particulier les signaux dopaminergiques transitoires tels ceux associés aux récompenses, aussi bien en situation physiologique que dans le cadre de la pathologie (e.g. maladie de Parkinson).

Pour ce faire l'approche d'imagerie de biosenseurs dans des préparations *ex vivo* a été utilisée, ce qui nous a permis de mesurer différentes efficacités fonctionnelles de la dopamine sur l'AMPC et les phosphorylations médiées par PKA dans les neurones épineux, tout en considérant les aspects spatiotemporels de la propagation du signal. Des modèles numériques ont également été élaborés en combinant nos données d'imagerie à des données de biochimie retrouvées dans la littérature, pour replacer nos observations dans un contexte encore plus proche de l'*in vivo*. Dans notre première étude l'objectif était de comprendre comment les neurones épineux de type D1 et D2 intègrent les signaux neuromodulateurs associés aux récompenses et processus d'apprentissage par renforcement positif, en mesurant la sensibilité des signaux AMPC ou PKA cytosoliques en réponse à des stimulations dopaminergiques transitoires (article 1). L'étude a été réalisée dans un contexte où il a été admis pendant longtemps que les différents états d'affinité des récepteurs D₁ et D₂ striataux conditionnent la réceptivité des deux types de neurones aux différents modes de signalisation par la dopamine, et où les neurones D2 en particulier sont considérés être insensibles à la dopamine transitoire, ce que nos résultats contredisent. Dans la deuxième étude l'objectif était pour nous d'étudier les spécificités d'intégration de ces stimuli transitoires, non plus à l'échelle du cytosol mais au niveau du compartiment nucléaire, là où sont initiés les effets neuromodulateurs menant aux adaptations neuronales au long cours. Nous avons observé une sensibilité toute particulière de la signalisation PKA dans le noyau des neurones striataux, l'existence d'un possible mécanisme de contrôle en avant des signaux PKA nucléaires, et l'étude a consisté à en identifier les déterminants moléculaires (article 2). Enfin nous nous sommes aussi intéressé à décrire comment les réponses types de ces neurones aux stimuli dopaminergiques transitoires peuvent être changées chez la souris 6-OHDA, modèle de la maladie de Parkinson, suite à la déplétion chronique en dopamine (travaux en cours). Nous montrons en

particulier comment la signalisation cytosolique AMPc/PKA stimulée par les récepteurs D₁ devient hypersensible dans le cadre de la maladie, une observation déjà rapportée dans la littérature et qui confirme la validité de notre approche. De plus, nous observons que la cellule met en place des adaptations à caractère homéostatique en aval des récepteurs, par une activité accrue des phosphodiésterases. L'objectif de ce projet plus transversal est donc d'améliorer nos connaissances sur la physiopathologie de la maladie, et d'aboutir à l'identification de cibles thérapeutiques ou biomarqueurs utilisables en clinique.

Matériel et méthodes

Animaux

Des souris C57Bl/6J ont été obtenues des centres d'élevage Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Les souris utilisées pour les expériences présentées dans les articles 1 et 2 étaient d'âge compris entre 8 et 12 jours. Les souris utilisées pour les expériences de l'article 3 étaient des mâles d'âge compris entre 5 et 13 semaines. Les souris étaient hébergées dans une animalerie à cycle 12h lumière/12h obscurité, dans des conditions stables de température (19-22°C), et disposant d'eau et de nourriture *ad libitum*. Les expériences ont été réalisées en accord avec la réglementation sur l'expérimentation animale du Ministère de l'Agriculture et des Forêts.

Biosenseurs FRET

Les biosenseurs Epac-S^{H150} (Polito et al., 2013), AKAR3 (Allen et Zhang, 2006), AKAR2-NLS (Zhang et al., 2005) et AKAR4 (Depry et al., 2011) ont été utilisés pour enregistrer les signaux AMPc et PKA intracellulaires dans des préparations de tranches de cerveau. En quelques mots : les biosenseurs FRET sont constitués d'un domaine senseur - soit sensible aux niveaux intracellulaires d'AMPc (biosenseurs de la famille Epac) soit aux phosphorylations médiées par la PKA (et déphosphorylations par les phosphatases; biosenseurs AKAR) - compris entre deux fluorophores dérivés de la GFP, un donneur et un accepteur. Lorsqu'un changement du signal biologique a lieu (par exemple, lorsque les niveaux d'AMPc intracellulaire augmentent ou diminuent), le domaine senseur subit un changement conformationnel. Suite à cela les fluorophores donneur et accepteur se rapprochent ou s'éloignent l'un de l'autre (ou changent d'orientation relative), menant *in fine* à un changement d'efficacité du FRET. Ce dernier est mesuré en temps réel par microscopie de fluorescence, et quantifié selon des méthodes ratiométriques (Castro et al., 2014, 2016). Davantage d'informations sur les méthodes de préparation des tranches (optimisée pour la survie des neurones pendant près de 24 heures), d'acquisition des signaux AMPc et PKA (imagerie de fluorescence plein champ et biphotonique), et de transfection des neurones (via virus sindbis) peuvent être retrouvées dans les méthodes des articles 1 et 2.

Infection virale

Un vecteur de transgène dérivé du virus sindbis (alphavirus à ARN simple brin, de polarité positive, capable de se répliquer dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes) a été utilisé pour permettre l'expression des biosenseurs Epac et AKAR dans nos préparations de neurones (Ehrengruber et al., 1999). Les séquences codantes des biosenseurs ont été insérées dans un plasmide pSinRep5 (Invitrogen, San Diego, Californie) et les virions produits dans des cellules BHK. Le vecteur viral obtenu présente un bon tropisme neuronal (cible peu les cellules gliales), et permet d'obtenir une traduction forte et une expression rapide (dès 8 heures d'incubation) du transgène, de façon spécifique et homogène dans les neurones, sans altérer leur morphologie. L'infection des tranches est réalisée par le dépôt de solution de virus (1 à 2 μ L de solution diluée, contenant près de 10^5 particules virales), avant l'étape d'incubation à 35°C en atmosphère humidifiée en présence de 5% CO₂- 95% O₂. Chez la souris âgée de plus de quatre semaines, la solution virale est injectée en intrastriatale (2 μ L de solution non diluée), et les tranches sont préparées le lendemain suivant un protocole optimisé pour la survie des neurones adultes.

Souris 6-OHDA : modèle de la maladie de Parkinson

Les souris ont subi une lésion 6-OHDA (Blum et al., 2001)(Blandini et al., 2008) intrastriatale unilatérale à l'âge de 5-6 semaines, ou bien une injection de solution saline en contrôle. Le protocole détaillé peut être retrouvé dans (Francardo et al., 2011), auquel quelques changements ont été ajoutés. Brièvement : 30 minutes avant la chirurgie, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de buprénorphine (Buprécare*, 0.05-0.1 mg/kg, Axience), antalgique morphinique, et de désipramine (25 μ g/kg, Sigma-Aldrich, France) pour limiter la toxicité de la 6-OHDA aux fibres dopaminergiques. Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (4-5 % pour l'induction; 1-2% pour l'entretien) et placées sur un cadre de chirurgie stéréotaxique, avec masque adapté pour la souris. La 6-OHDA (Sigma-Aldrich, France) a été dissoute à concentration de 3,2 μ g/ μ L en base libre dans une solution saline glacée contenant 0.02% d'acide ascorbique, et utilisée dans les deux heures suivant sa préparation. La 6-OHDA (ou solution saline véhicule pour les souris SHAM) a été injectée dans deux sites (2x 1 μ L) du striatum droit. Les coordonnées étaient les suivantes : (1) AP =

+0,3 mm, ML = -2,0 mm, DV = -3,0 mm (2) AP = +1,0 mm, ML = -2,0 mm, DV = -3,0 mm (Franklin and Paxinos, 2007). Pour minimiser les dommages tissulaires non spécifiques, les injections ont été réalisées à vitesse de 0,4 μ L/min, en utilisant un capillaire en verre dont l'extrémité mesure entre 80-120 μ m de diamètre, attaché à un Nanoject II (Drummond Scientific). Le capillaire a été laissé en place deux minutes avant et après l'injection. Une solution saline de glucose (0.1 mL/10 g, en sous-cutanée) a été administrée quotidiennement pour prévenir la déshydratation des souris dans les premiers jours post-opératoires. Des croquettes de céréales imbibées d'une solution d'eau sucrée ont aussi été placées dans les cages d'hébergement pour stimuler l'appétit des animaux lésés et les revigorer. Deux-trois semaines de récupération ont été accordées avant la préparation des tranches de cerveau et les enregistrements d'imagerie. La réussite des lésions 6-OHDA a été contrôlée chez tous les animaux de l'étude par l'immunomarquage de la tyrosine hydroxylase.

Stimulation pharmacologique des récepteurs

Les neurones dans lesquels sont effectuées les mesures d'imagerie sont stimulés pharmacologiquement par des drogues variées (Table 4), appliquées via un bain de perfusion de solution tampon bicarbonate (BBS, *bicarbonate buffer saline*). Les stimuli dopaminergiques transitoires sont réalisées par la technique de décageage de dopamine (photolibération), détaillée dans les méthodes des articles 1 et 2. Les applications locales rapides de certaines drogues comme la forskoline sont réalisées avec un système de microperfusion, détaillé dans les méthodes de l'article 2.

Droque	Concentrations d'usage	Pharmacodynamique
NPEC-dopamine (NPEC-DA)	1 nM à 10 μ M	Agoniste des récepteurs D ₁ et D ₂ -like
apomorphine	1 μ M	Agoniste des récepteurs D ₁ et D ₂ -like
SKF-38393	1 μ M	Agoniste des récepteurs D ₁ -like
SKF-81297	100 nM à 1 μ M	Agoniste des récepteurs D ₁
SCH-23390	1 μ M	Antagoniste des récepteurs D ₁ -like
quinpirole	1 à 5 μ M	Agoniste des récepteurs D ₂ -like
halopéridol	100 nM	Antagoniste des récepteurs D ₂ -like
CGS 21680	1 μ M	Agoniste des récepteurs A _{2A}
PSB36	100 nM	Antagoniste des récepteurs A ₁
tétradotoxine (TTX)	200 nM	Bloquant des canaux Na ⁺
atropine	1 μ M	Antagoniste des récepteurs muscariniques
CGP 55845A	100 nM	Antagoniste des récepteurs GABA _B
AM 251	100 nM	Antagoniste des récepteurs CB-1
naloxone	500 nM	Antagoniste des récepteurs opioïdes
forskoline (fsk)	200 nM à 13 μ M	Activateur des Adénylyl cyclases
IBMX	200 μ M	Inhibiteur non sélectif des PDEs
TP-10	1 μ M	Inhibiteur de PDE10
BAY-607550	200 nM	Inhibiteur de PDE2
rolipram	100 nM	Inhibiteur de PDE4
cantharidine	30-50 μ M	Inhibiteur de PP-1 et PP-2A
fostriécine	200 nM	Inhibiteur de PP-2A
FK506	5-10 μ M	Inhibiteur de PP-2B
cyclosporine A	5 μ M	Inhibiteur de PP-2B

Table 4 : Drogues utilisées lors des enregistrements d'imagerie de biosenseurs

Modélisation in silico

Dans nos expériences d'imagerie la durée des réponses du biosenseur AKAR aux stimuli dopaminergiques transitoires apparaît plus longue que la durée des réponses AKAR rapportées dans d'autres études où la dopamine est libérée par optogénétique (Yagishita et al.,

2014). Cette observation suggère que la dopamine libérée par notre technique de “décageage” demeure dans nos préparations pendant plusieurs dizaines de secondes, alors que la dopamine phasique rencontrée *in vivo* dans les paradigmes d’apprentissage lié à la récompense, qui résulte des dépolarisations en rafales des neurones dopaminergiques, ne dure que quelques secondes. En conséquence, pour évaluer la dynamique des réponses AMPc/PKA à des stimulations de durée plus proche de l’*in vivo*, les docteurs Anu Nair et Jeanette Koteleski ont élaboré pour nos études des modèles de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones D1 et D2 striataux. Ces modèles ont été développés à partir de données expérimentales publiées par plusieurs groupes et à partir de nos données d’imagerie. Les différentes réactions biochimiques initiées par l’activation des récepteurs à la dopamine ont été modélisées par des équations différentielles ordinaires, émettant l’hypothèse que chacune d’elle obéisse à la loi d’action de masse (cf. méthodes des articles 1 et 2).

Résultats

Article 1 : Détection des signaux dopaminergiques phasiques par les neurones épineux striataux de types D1 et D2

La libération phasique de dopamine dans le striatum est un élément clé de l'apprentissage motivé par les récompenses et de la sélection des actions. Pourtant la dynamique des effets de la dopamine sur les voies de signalisation intracellulaires dans les neurones épineux striataux reste encore peu documentée. Dans cette première étude nous avons utilisé des biosenseurs FRET codés génétiquement et exprimés dans des tranches de cerveau de souris pour suivre en temps réel les niveaux intracellulaires d'AMPC et de phosphorylation par la PKA, en même temps dans le cytosol des neurones épineux moyens striataux de type D1 et de type D2. Nous avons quantifié les effets d'une libération transitoire de dopamine sur la signalisation AMPC/PKA, la voie canoniquement modulée par les récepteurs à la dopamine des types D₁- et D₂-like. Ces données expérimentales ont permis de contraindre les paramètres d'un modèle numérique. Dans la partie dorso-médiane du striatum où nous avons effectué nos enregistrements, les neurones épineux moyens D1 et D2 expriment les récepteurs D₁- ou D₂- like de façon ségrégée, et ont répondu efficacement aux stimuli dopaminergiques transitoires par une augmentation ou par une diminution des niveaux d'AMPC, respectivement.

Nos résultats indiquent plus précisément que la dopamine module l'AMPC dans les deux types de neurones épineux avec une efficacité comparable (EC₅₀ de l'ordre du sub-micromolaire), et remettent en cause l'idée communément acceptée dans la discipline que l'efficacité de la dopamine est nettement plus grande sur les récepteurs D₂ que sur les récepteurs D₁. Par ailleurs nous avons aussi observé dans les neurones épineux D2 que la baisse nette des niveaux d'AMPC occasionnée par la stimulation transitoire des récepteurs D₂ n'entraîne pas de baisse concomitante du niveau des phosphorylations PKA-dépendantes. Notre modèle *in silico* indique que cela est en partie dû à l'inhibition efficace de la protéine phosphatase PP1 par la protéine DARPP-32. De plus dans ces neurones, le modèle indique aussi que l'activité nette

PKA (équilibre PKA/phosphatase) est particulièrement sensible aux fluctuations du niveau tonique en dopamine (échelle submicromolaire), rendant les neurones D2 capables de détecter efficacement les interruptions/pauses en dopamine, associées aux omissions de récompense et punitions. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les neurones épineux D2 sont capables de détecter avec une certaine complexité différents motifs de signalisation par la dopamine.

Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons

Cedric Yapo^{1,2,*}, Anu G. Nair^{3,4,5,*}, Lorna Clement¹, Liliana R. Castro^{1,2}, Jeanette Hellgren Kotaleski^{3,6} and Pierre Vincent^{1,2} 

¹CNRS, UMR8256 “Biological Adaptation and Ageing”, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), F-75005 Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris 6), Sorbonne Universités, F-75005 Paris, France

³Science for Life Laboratory, School of Computer Science and Communication, KTH Royal Institute of Technology, 10044 Stockholm, Sweden

⁴National Centre for Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore 560065, Karnataka, India

⁵Manipal University, Manipal 576104, Karnataka, India

⁶Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Solna, Sweden

Key points

- Brief dopamine events are critical actors of reward-mediated learning in the striatum; the intracellular cAMP–protein kinase A (PKA) response of striatal medium spiny neurons to such events was studied dynamically using a combination of biosensor imaging in mouse brain slices and *in silico* simulations.
- Both D1 and D2 medium spiny neurons can sense brief dopamine transients in the sub-micromolar range.
- While dopamine transients profoundly change cAMP levels in both types of medium spiny neurons, the PKA-dependent phosphorylation level remains unaffected in D2 neurons.
- At the level of PKA-dependent phosphorylation, D2 unresponsiveness depends on protein phosphatase-1 (PP1) inhibition by DARPP-32.
- Simulations suggest that D2 medium spiny neurons could detect transient dips in dopamine level.

Abstract The phasic release of dopamine in the striatum determines various aspects of reward and action selection, but the dynamics of the dopamine effect on intracellular signalling remains poorly understood. We used genetically encoded FRET biosensors in striatal brain slices to quantify the effect of transient dopamine on cAMP or PKA-dependent phosphorylation levels, and computational modelling to further explore the dynamics of this signalling pathway. Medium-sized spiny neurons (MSNs), which express either D₁ or D₂ dopamine receptors, responded to dopamine by an increase or a decrease in cAMP, respectively. Transient dopamine showed similar sub-micromolar efficacies on cAMP in both D1 and D2 MSNs, thus challenging the commonly accepted notion that dopamine efficacy is much higher on D₂ than on D₁ receptors. However, in D2 MSNs, the large decrease in cAMP level triggered by transient dopamine did not translate to a decrease in PKA-dependent phosphorylation level, owing to the efficient inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32. Simulations further suggested that D2 MSNs can also operate in a ‘tone-sensing’ mode, allowing them to detect transient dips in basal dopamine. Overall, our results show that D2 MSNs may sense much more complex patterns of dopamine than previously thought.

*C. Yapo and A. G. Nair contributed equally to this work.

(Received 8 April 2017; accepted after revision 10 July 2017; first published online 7 August 2017)

Corresponding author P. Vincent: UMR8256 "Biological Adaptation and Ageing", Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), F-75005 Paris, France. Email: pierre.vincent@upmc.fr

Abbreviations AC, adenylyl cyclase; caged fluorescein, fluorescein bis-(5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl) ether; DARPP-32, dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa; DMSO, dimethyl sulfoxide; fsk, forskolin; IBMX, 3,7-dihydro-1-methyl-3-(2-methylpropyl)-1H-purine-2,6-dione; LED, light-emitting diode; MSN, medium spiny neuron; NPEC-DA, (N)-1-(2-nitrophenyl)ethylcarboxy-3,4-dihydroxyphenethylamine, a caged version of dopamine; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A; PP, protein phosphatase; TTX, tetrodotoxin.

Introduction

Numerous aspects of the striatal function in behavioural tasks involve dopamine neurotransmission (Schultz, 2002; Nelson & Kreitzer, 2014). Midbrain dopaminergic neurons exhibit two distinct modes of firing: a pacemaker firing pattern (0.5–8 Hz), which generates tonic levels of dopamine, and a transient burst firing pattern (>15 Hz), which accounts for the phasic release of dopamine (Grace & Bunney, 1984a,b; Paladini & Roeper, 2014; Grace, 2016). In the striatum, the phasic release of dopamine is associated with reward-predicting stimuli and lasts from less than a second to a few seconds (Gonon, 1997; Day *et al.* 2007; Schultz, 2010). Conversely, the omission of an expected reward, along with punishments, are associated with a depression in the activity of the dopaminergic neurons, thus resulting in a dip in tonic dopamine levels (Schultz & Romo, 1987; Mireniewicz & Schultz, 1996; Matsumoto & Hikosaka, 2009; Hart *et al.* 2014).

The striatum consists mostly of GABAergic medium-sized spiny neurons (MSNs), which receive convergent excitatory inputs from cortical and thalamic areas involved in sensorimotor, cognitive and affective functions, and which further project to the output nuclei of the basal ganglia circuitry (Kreitzer, 2009; Lovinger, 2010; Gerfen & Surmeier, 2011; Surmeier *et al.* 2011). In these neurons, dopamine signals are transduced through the activation of D₁-like and D₂-like dopamine receptors, which control the cAMP–protein kinase A (PKA) cascade in an opposite manner, and thereby regulate important neuronal functions through a number of cellular targets including membrane channels, receptors and nuclear proteins (Reynolds *et al.* 2001; West & Grace, 2002; Surmeier *et al.* 2007; Kheirbek *et al.* 2008; Shen *et al.* 2008; Bertran-Gonzalez *et al.* 2009; Higley & Sabatini, 2010; Cerovic *et al.* 2013; Biever *et al.* 2015; Kozorovitskiy *et al.* 2015). D₁ and D₂ receptors, the main dopamine receptor subtypes in the dorsal striatum, are segregated in two functionally antagonistic types of MSNs: the D1 MSNs, of the anatomical 'direct pathway', which express preferentially the D₁ receptors and thus respond to dopamine with an activation of cAMP–PKA signalling, and the D2 MSNs, of the 'indirect pathway', which express preferentially the D₂ receptors and respond to dopamine with an inhibition of cAMP–PKA signalling (Valjent *et al.* 2009;

Bertran-Gonzalez *et al.* 2010; Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

In a context where the temporal pattern of dopamine release bears important physiological significance in determining the postsynaptic response (Arbuthnott & Wickens, 2007; Marcott *et al.* 2014; Yagishita *et al.* 2014; Swapna *et al.* 2016), surprisingly, the efficacy of dopamine on the intracellular signalling cascade remains poorly documented. It is commonly assumed that D₁ and D₂ receptors respond differently to phasic and tonic dopamine: phasic dopamine, which can reach micromolar concentration, is thought to activate the predominantly low-affinity D₁ receptors, while the much lower level of tonic dopamine would be sensed selectively by the D₂ receptors. This assumption stems from measurements of receptor affinities (Richfield *et al.* 1989), but binding approaches have provided a number of conflicting results (Cumming, 2011; Skinbjerg *et al.* 2012). Moreover, receptor affinity does not correlate to functional efficacy on intracellular signals through a simple relationship (Kenakin, 2013). End-point measurements of dopamine action upon intracellular signalling have also provided conflicting results, in particular for the D₂ receptor, with EC₅₀ values for dopamine ranging from nanomolar to tens of micromolar. Importantly, the temporal conditions of dopamine action were not considered in these studies although strong D₁ receptor desensitization has been reported (Dumartin *et al.* 2000; Kim *et al.* 2004) and a powerful heterologous sensitization was described for the D₂ receptor (Watts & Neve, 1996; Watts *et al.* 1998). A big leap forward was made with the optogenetic release of endogenous dopamine and electrophysiological monitoring of dopamine action through GIRK2 channels, which demonstrated the unexpected ability of D₂ receptors to sense transient dopamine signals (Marcott *et al.* 2014). However, this approach reported an EC₅₀ for dopamine in the range of tens of micromolar, which is hardly compatible with striatal dopamine levels *in vivo*. In addition, this latter approach could not provide a comparison of dopamine efficacy between D₁ and D₂ receptors under the same conditions. More importantly, it did not provide information about dopamine efficacy on the cAMP–PKA signalling pathway.

In this study, we used biosensor imaging on mouse striatal brain slices, photo-release of caged dopamine

and computational modelling to investigate the effect of transient dopamine signals on cAMP–PKA signalling, in both D1 and D2 striatal MSNs concurrently. Our results first reveal that transient dopamine activates D₁ and D₂ receptors with efficacies in the same sub-micromolar order of magnitude, with around a twofold difference only, thus challenging the notion of a large difference in dopamine efficacies between D₁ and D₂ receptors. Transient dopamine triggers ‘mirror’ cAMP transients in their respective neurons, but interestingly, D2 MSNs depart from this symmetry at the level of the phosphorylation state of targets controlled by PKA and phosphatases. This observation implies that the same input signal can be read out differently at different stages along a signalling pathway, which would represent a way for the system to detect the specific dynamic features of the neuromodulatory input signal. Computational simulations using these measured data further indicate that D2 MSNs, but not D1 MSNs, could also respond to the transient dips in dopamine level often associated with reward omission.

Methods

Animals and live brain slice preparation

C57Bl/6J mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France) and housed under standardized conditions with a 12 h light–dark cycle, stable temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), controlled humidity ($55 \pm 10\%$) and food and water *ad libitum*. Animals were kept in accordance with the UPMC University animal care committee’s regulations. All the experiments were performed in accordance with the French Ministry of Agriculture and Forestry guidelines for handling animals (decree 87–848).

Brain slices were prepared from a total of 140 mice aged from 7 to 11 days. Mice were killed by decapitation and the brain was quickly removed. Coronal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica). Slices were prepared in an ice-cold solution of the following composition: 125 mM NaCl, 0.4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 5 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose and 1 mM kynurenic acid, saturated with 5% CO_2 and 95% O_2 . The slices were incubated in this solution for 30 min at room temperature and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50% Hanks’ Balanced Salt Solution, 6.5 g l^{-1} glucose, penicillin-streptomycin, Invitrogen, San Diego, CA, USA). We used the Sindbis virus as a vector to induce expression of the biosensors after overnight incubation (Ehrengruber *et al.* 1999). The coding sequences of Epac-S^{H150} (Polito *et al.* 2013) and AKAR3 (Allen & Zhang, 2006) were inserted into the viral vector pSinRep5 (Invitrogen). Viral particles ($\sim 5 \times 10^5$ particles per slice) were added and slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5%

CO_2 . Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (125 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 5 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, saturated with 5% CO_2 and 95% O_2). Recordings were performed with a continuous perfusion ($2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) of the same solution, at 32°C , saturated with 5% CO_2 and 95% O_2 . Except for the experiments shown in Fig. 6, all drugs were added in this continuous bath perfusion. Fast application of SCH23390 (Fig. 6) was performed using a rapid micro-perfusion system, using a glass pipette to apply the drug locally over the imaging field as described earlier (Gervasi *et al.* 2007). This system has a delay of 1 s for the drug to reach the surface of the brain slice. The drug then diffuses through the slice to reach the imaged neurons within ~ 10 s (Gervasi *et al.* 2007).

Since other endogenous neuromodulators might interfere with the response to dopamine, a cocktail of inhibitors was used throughout the uncaging experiments: tetrodotoxin to block electrical activity (200 nM); atropine, a muscarinic receptor antagonist (1 μM); CGP 55845A, a GABA-B receptor antagonist (100 nM); AM 251, a CB-1 receptor antagonist (100 nM); naloxone, an opioid receptor antagonist (500 nM).

Live brain slice imaging

Recordings were performed with 40×0.8 NA water-immersion objectives. For two-photon imaging, excitation was obtained using a Ti:sapphire laser (MaiTai HP; Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA) tuned at 850 nm for donor excitation. Galvanometric scanners (model 6210, Cambridge Technology, Cambridge, MA, USA) were used for raster scanning, and a piezo-driven objective scanner (P-721 PIFOC, Physik Instrumente GmbH) was used for Z-stack image acquisition. The system was controlled by MPscope software (Nguyen *et al.* 2006). The microscope was based on an Olympus BX51WI upright microscope. A two-photon emission filter was used to reject residual excitation light (E700 SP, Chroma Technology, Brattleboro, VT, USA). A fluorescence cube containing 479/40 and 542/50 emission filters and a 506 nm dichroic beamsplitter (FF01-479/40, FF01-542/50 and FF506-Di02-25 $\times$ 36 Brightline Filters, Semrock, Rochester, NY, USA) was used for the orthogonal separation of the two fluorescence signals. Two imaging channels (H9305 photomultipliers, Hamamatsu) were used for simultaneous detection of the two types of fluorescence emission. For each data point, an image Z-stack of 30–40 images with 0.5 μm interval was acquired. The frequency of data acquisition was approximately 1 pair of stacks every 30 s.

Wide-field images were obtained with an Olympus BX50WI or BX51WI upright microscope and an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Images were acquired

with iVision (Biovision, Exton, PA, USA). The excitation and dichroic filters were D436/20 and 455dcxt. Signals were acquired by alternating the emission filters, HQ480/40 for donor, and D535/40 for acceptor, with a filter wheel (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Filters were obtained from Chroma Technology (Brattleboro, VT, USA).

Photorelease of dopamine from NPEC-DA was performed using high power 360 nm LED sources mounted on the epifluorescence port of the microscopes, providing 15 mW at the exit of the microscope objective (0.5 s flash duration) or 7.5 mW (1 s flash duration). The combination of LED sources at 360 nm (for uncaging) and 420 nm (for imaging) was purchased from Mightex (Toronto, Canada). The frequency of data acquisition, usually 1 image pair every 30–50 s, was increased to 1 pair every 5 s, starting 10 data points before dopamine uncaging.

The dorsomedial part of the striatum was identified with a 5× objective. In order to identify the neurons in the field of view, recordings in wide-field microscopy were terminated by the acquisition of an image stack of 100 μm depth. MSNs were identified by their morphology in 3D image stacks: we rejected the few cells that didn't display an obvious neuronal morphology, smooth membrane contour and a soma diameter of less than 13 μm , thus excluding giant cholinergic interneurons. We further discarded very few cells which did not respond to either D₁ or A_{2A} stimulation.

Data analysis

The FRET change in the biosensor was quantified by ratiometric imaging: cAMP binding to Epac-S^{H150} is associated with an increase in donor/acceptor ratio; PKA-dependent phosphorylation is associated with an increase in acceptor/donor ratio (Polito *et al.* 2014). Images were analysed with custom routines written in the IGOR Pro environment (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied, since this correction, while increasing the absolute amplitude of ratio changes, also increases the noise in the measurement and does not enhance measurement precision (Ducros *et al.* 2009). The emission ratio was calculated for each pixel: F_{480}/F_{535} for Epac-S^{H150} sensor, and F_{535}/F_{480} for AKAR3 sensor. The pseudo-colour images display the ratio value coded in hue and the fluorescence of the preparation coded in intensity.

Two-photon imaging was used in some experiments for unambiguous separation and identification of D1 and D2 MSNs in the slice (Fig. 1). Ratio measurements were performed on a series of 5–10 consecutive images from the image stack, centred on the cell body. When visible, the nucleus was excluded from the measurement. Wide-field imaging also allowed separation of D1 and D2

MSNs provided that the infection level was kept low, and fields without fluorescence overlap between neighbouring neurons were chosen. The optical cross-contamination resulting from out of focus light was evaluated by the response to CGS 21680 and SKF-81297: cells were rejected from analysis if the cross-contamination was above 30%. Cells were also excluded from the analysis when basal ratio was elevated.

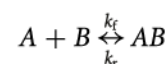
Responses obtained from MSNs of the same type were averaged for each experiment (i.e. brain slice).

Drugs

Salts to prepare the solutions were from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, Isère, France). TTX was from Latoxan (Valence, France). Caged fluorescein (fluorescein bis-(5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl) ether, dipotassium salt) was from ThermoFisher. All other drugs were from Tocris Cookson (Bristol, UK). The stock solutions were prepared by dissolving the powders with either DMSO (dimethyl sulfoxide) or water. All stock solutions were stored at −20°C. NPEC-DA was aliquoted in 5 μL samples and discarded at the end of the day. Solution containing NPEC-DA was protected from ambient light.

Computational modelling

The biochemical signalling networks for both D1 and D2 MSN are modelled as a system of chemical reactions present in a single reaction compartment devoid of any geometry. The temporal evolution of individual chemical reaction is modelled as an



ordinary differential equation (ODE) using the chemical mass-action equation, as:

$$\frac{-d[A]}{dt} = \frac{-d[B]}{dt} = \frac{d[AB]}{dt} = k_f[A][B] - k_r[AB].$$

If a reaction is irreversible, the reverse rate constant k_r is set to 0. The enzymatic reactions (involving enzyme E, substrate S and product P) in the signalling cascade are modelled as a two-step binding (reversible) and transformation (irreversible) reaction. The signalling networks are represented as a system of coupled ODEs. Simulations of these reaction systems are done using the ode15s solver available in the MATLAB Simbiology toolbox (MathWorks) with a maximum time step of 0.01 s. The description about the signalling processes that are represented as chemical reactions are presented below. The reaction-kinetic models built in this study is publicly available at BioModels database (Chelliah *et al.* 2015) in SBML format which include all the modelled biochemical

reactions and respective rate parameters (Model IDs: MODEL1701170000, MODEL1701170001).

Modelled signalling network

The modelled biochemical network for D1 MSNs includes the signalling processes triggered by the

dopamine-dependent activation of D₁ receptor, which is coupled to G_{olf} G-protein. Activation of D₁ receptor leads to the activation of G_{olf} G-protein. The kinetic parameters of the all the receptors and G-protein activation that we used are constrained to obtain an activation time constant in the range of 50–100 ms as suggested by measurements in neurons (Chuhma *et al.* 2014; Marcott *et al.* 2014).

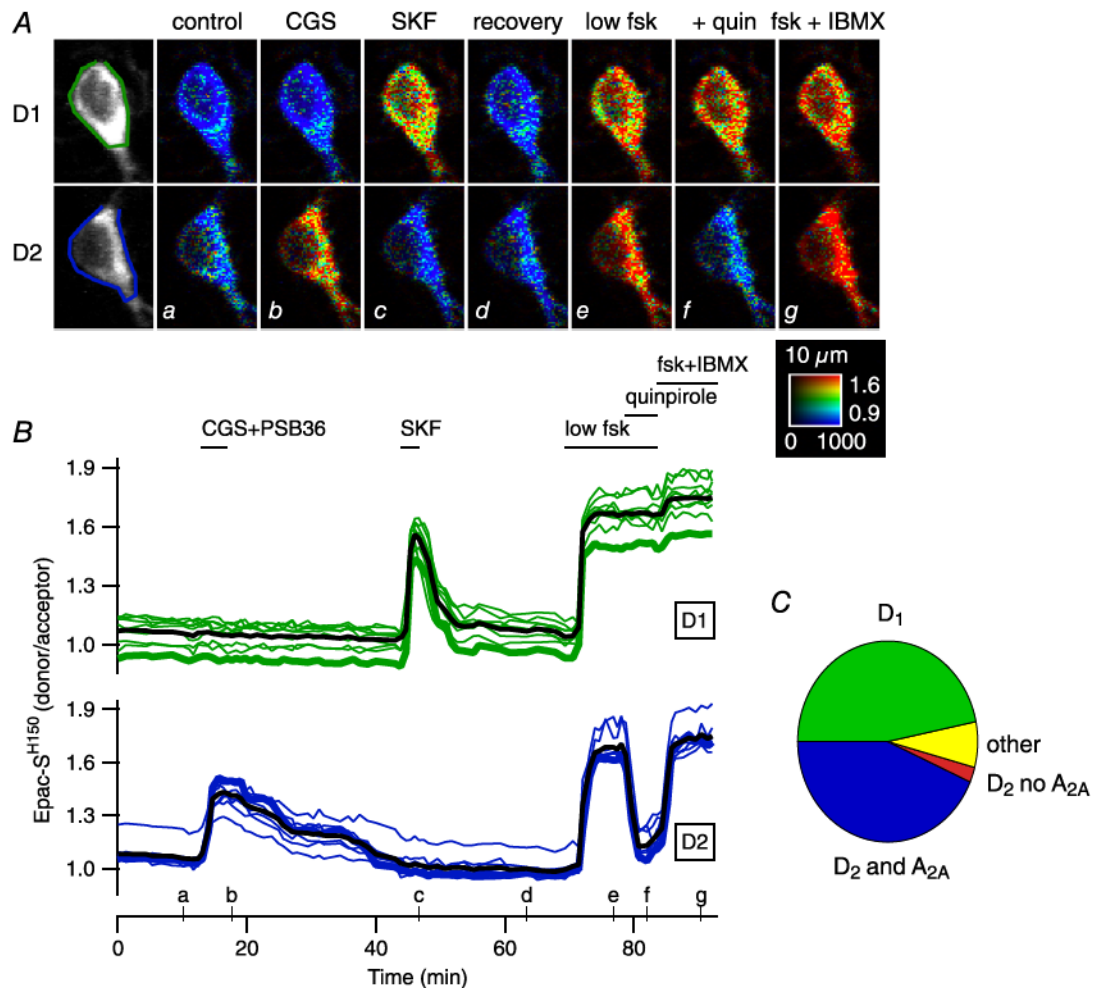


Figure 1. D₁ and A_{2A}/D₂ responses are segregated in two main types of neurons in the dorsal striatum
 A, two representative D₁ and D₂ MSNs (out of 21) in a brain slice expressing the cAMP biosensor Epac-SH¹⁵⁰, imaged with two-photon microscopy: raw fluorescence of the donor is displayed in grey and donor/acceptor fluorescence ratio is displayed in pseudo-colour. Images a–g show the ratio corresponding to the time points indicated on the graph below in B. B, each trace indicates the emission ratio measured on the cell body of individual neurons. Traces are grouped on the basis of their similar response pattern. Thick traces correspond to the two cells illustrated in A. Black traces represent the average response. Bath application of the adenosine A_{2A} agonist CGS 21680 (1 μM), in the presence of the antagonist of A₁ receptors PSB36 (0.1 μM), revealed which MSNs express A_{2A} receptors (blue traces). Bath application of SKF-81297 (SKF, 100 nM) revealed MSNs which express D₁-like receptors (green traces). A low dose of forskolin (low fsk, 0.5 μM) increased cAMP in all MSNs. Addition of the D₂-like agonist quinpirole (1 μM) decreased cAMP in the neurons which also responded to A_{2A} agonist. The final application of forskolin (to activate adenylyl cyclases, fsk, 13 μM) and IBMX (to inhibit phosphodiesterases, 200 μM) showed the maximal ratio response for each neuron. The calibration square indicates from left to right increasing intensity levels, from bottom to top increasing ratio values, i.e. increasing intracellular cAMP concentration. The size of the square is 10 μm. C, 205 neurons from 6 similar experiments sorted into 4 categories: neurons responding to SKF (D₁ MSNs), neurons responding to both CGS and quinpirole (D₂ MSNs; D₂ and A_{2A}), neurons responding only to quinpirole (D₂ no A_{2A}), and neurons responding to nothing except the final fsk+IBMX (others).

Once activated, G_{olf} binds to AC5. The duration of the AC5 activation due to G_{olf} is dictated by the GTPase activity of the G-protein, which acts as the deactivation mechanism of the G-protein. The ligand–receptor interactions and the G_{olf} –AC5 interactions are modelled as reversible binding reactions whereas the G_{olf} activation and deactivation processes are modelled as single step irreversible reactions. The binding of G_{olf} with AC5 leads to an elevation cAMP production. This increased rate of cAMP production is modelled by an increased k_{cat} , without affecting K_M , of ATP to cAMP conversion in the reactions involving G_{olf} -bound AC5 compared to only AC5. In the current preparation, cAMP changes are measured through Epac- S^{H150} sensor. Thus, Epac- S^{H150} has also been included in the model to assist the optimization of cAMP-related kinetic parameters. The cAMP binding parameters of Epac- S^{H150} were constrained using the known dose-dependent relation between cAMP and Epac- S^{H150} (Polito *et al.* 2013). Since PDE10 is the most expressed PDE variant in the striatum (Kelly *et al.* 2014), it is the only PDE included in the model. The kinetic rate parameters of PDE10 were selected to match the time course of the Epac- S^{H150} signal observed in the current dataset. cAMP further activates PKA and this PKA activation is modelled as a two-step sequential binding reaction between cAMP and PKA holoenzyme, followed by a single step dissociation between the regulatory and catalytic subunit. The parameters for these and dissociation reactions are constrained by the known dose-dependent relation between cAMP and PKA (Dostmann & Taylor, 1991). PKA activation also leads to AKAR3 phosphorylation in our model. We refined the PKA activation and the PKA-dependent AKAR3 phosphorylation parameters to reproduce the time course and dose response of AKAR3 signal observed in the dataset presented here. The parameters are further constrained by the previously observed AKAR activation/deactivation kinetics in response to transient dopamine stimulation (Yagishita *et al.* 2014).

The catalytic subunit of PKA also phosphorylates the Thr-34 residue of DARPP-32 and the phosphorylated Thr-34 binds to PP1 with high affinity (Huang *et al.* 1999). This residue is dephosphorylated strongly by PP2B and there also appears to be some contribution of PP2A (Nishi *et al.* 2002; Ahn *et al.* 2007b). However, the quantitative difference in the contribution between these different dephosphorylating forces is not clear. Thus, in our model, for simplicity, we assume that all the dephosphorylation of Thr-34 residue is carried by a single pool of PP2B. It is also assumed that this pool of PP2B directly acts on phosphorylated Thr-34 species which is in free state and not bound to PP1. The PP2B-dependent dephosphorylation parameters are adjusted to reproduce previously published changes in Thr-34 levels upon PP2B stimulation (Nishi *et al.* 2002, 2005). The DARPP-32

signalling network module also contains phosphorylation and dephosphorylation of Thr-75 residue by CDK5 and PP2A, respectively (Bibb *et al.* 1999; Ahn *et al.* 2007a,b).

The modelled signalling network for D2 MSN has the same signalling core (from AC5 upstream to DARPP-32 downstream) as the D1 network. The main differences between D2 and D1 models are at the level of receptors and G-proteins: the D2 signalling network includes A_{2A} and D_2 receptors coupled to G_{olf} and $G_{i/o}$ G-proteins, respectively. The receptor and G-protein activation kinetics used are similar to the ones of the D1 model. As mentioned above, the deactivation kinetics of G-protein is dictated by the GTPase activity of the G-proteins. The deactivation kinetics of G_{olf} in the D2 computational model is the same as the value used in the D1 model. However, the deactivation of $G_{i/o}$ is assumed to be around ten times faster than the G_{olf} value. This is based on the observation that striatal neurons are enriched with RGS proteins, which enhance the GTPase rate of $G_{i/o}$ proteins (Gold *et al.* 1997). Similar to the D1 model, the active G_{olf} due to ligand-bound A_{2A} receptor binds to AC5 thereby increasing the rate of cAMP production. In addition, the ligand–receptor interaction for A_{2A} receptor and the G_{olf} –AC5 interactions are modelled as reversible binding reactions whereas the G_{olf} activation and deactivation processes are modelled as single step irreversible reactions. The increased cAMP production for G_{olf} –AC5 is modelled by increasing the k_{cat} , without affecting K_M , of ATP to cAMP conversion in the reactions involving G_{olf} -bound AC5 compared to only AC5. On the other hand, the activation of D_2 receptor leads to the activation of $G_{i/o}$. The active $G_{i/o}$ binds to AC5 and the $G_{i/o}$ –AC5 complex has a reduced rate of cAMP production, modelled by decreasing the k_{cat} , without affecting K_M , of ATP to cAMP conversion in the reactions involving $G_{i/o}$ -bound AC5 compared to only AC5. Since the core signalling network is the same between the two models, the biochemical reactions and respective kinetic rate parameters are also the same, except that of receptor activation–deactivation cycle. The A_{2A} and D_2 receptor-related rate parameters and the initial amounts of receptors and G-proteins have been constrained to reproduce the Epac- S^{H150} and AKAR3 time course and dose response observed for D2 MSNs in our experiments upon dopamine uncaging. Apart from the receptor/G-protein parameters, there are also differences in the amounts of PP1, PP2B and PP2A between the two models. The levels of these phosphatases are lower in the D2 model compared to the D1 model, to account for the D2 neuron-specific DARPP-32 observation (Bateup *et al.* 2008).

Model inputs

The main input to both models is dopamine. There are three kinds of dopamine inputs considered in this study:

Dopamine peak. These inputs represent the temporary and time-varying elevation of the extracellular dopamine concentration.

- (i) Simulated dopamine uncaging. This input simulates the dopamine elevation produced in our dopamine uncaging experimental protocol. It is modelled as an instantaneous increase in dopamine concentration to a given amplitude (representing the fast action of UV pulse on NPEC-DA) followed by an exponential decay (representing the clearance of uncaged dopamine). The time constant of the exponential decay is ~ 90 s, which closely reproduces the time course of Epac-SH150 and AKAR3 time course for both D1 and D2 models. This input is mainly used in the process of model fitting.
- (ii) Brief dopamine peak. This represents a brief transient change in dopamine concentration, in the order of a few seconds. It is modelled as a positive rectangular pulse with a given amplitude for a given pulse duration. The basal dopamine level used outside the pulse duration is zero.

Dopamine dip. This input represents the transient decrease in the extracellular dopamine concentration with respect to a given basal level. It is modelled as a negative rectangular pulse with the dopamine concentration set to zero during the duration of the pulse. The dopamine concentration outside the pulse is given a constant basal level.

Results

Segregated D₁ and A_{2A}/D₂ responses in the dorsomedial striatum

D₁-like and D₂-like dopamine receptors are oppositely coupled to the cAMP–PKA signalling cascade. Here, we imaged the fluorescence of the Epac-S^{H150} biosensor with a two-photon microscope to observe, in real time, how the activation of D₁- and D₂-like dopamine receptor subtypes affected intracellular cAMP levels in mouse MSNs (Fig. 1).

First, bath application of the A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, 1 μ M) increased intracellular cAMP in about half of the MSNs present in the field of view, revealing the A_{2A} positive neurons (Fig. 1A and B). Since CGS 21680 is also an agonist of adenosine A₁ receptor (Klotz *et al.* 1999; Gao *et al.* 2004), which is expressed in the striatum, all applications of CGS 21680 were performed in the presence of the A₁ receptor antagonist PSB36 (100 nM). After the washout of the agonist and recovery of the cAMP level to baseline, bath application of the D₁ receptor agonist SKF-81297 (SKF, 100 nM) increased cAMP signal in the other half of the MSNs present in the field of view, the D1 MSNs. Finally, the functional presence of the D₂ receptors

was revealed by first increasing cAMP production in all neurons with a low dose of the adenylyl cyclase activator forskolin (0.5 μ M), followed by the application of the D₂ receptor agonist quinpirole (1 μ M): quinpirole reverted the forskolin response in the MSNs which responded to A_{2A} receptor agonist CGS 21680; in contrast, D1 MSNs showed no response to quinpirole (Fig. 1A and B).

Out of 205 neurons in total, from six independent experiments (18 to 56 neurons per experiment), none of the tested neurons responded to the activation of both D₁ and D₂ receptors. Ninety-six neurons responded to the activation of D₁ receptor only (hereafter called D1 MSNs) and 89 neurons responded to the activation of both A_{2A} and D₂ receptors (hereafter called D2 MSNs). Five neurons responded to D₂ receptor activation but failed to respond to A_{2A} receptor activation. Fifteen neurons, among which a few were putative aspiny cholinergic interneurons, responded to none of the drugs except to fsk and IBMX (Fig. 1C). Our experiments are thus in agreement with previous studies (Bertran-Gonzalez *et al.* 2008; Valjent *et al.* 2009), showing that, in the dorsal striatum, D₁ and D₂ receptors are segregated in two sub-populations of MSNs, with D₂ being co-expressed with A_{2A} receptors.

Dopamine uncaging triggers transient and opposite cAMP signal changes in D1 and D2 MSNs

Phasic release of dopamine in the striatum is commonly assumed to occur after a burst of action potentials in dopaminergic neurons, in response to a reward event (Schultz, 2010). Here, we increased the temporal resolution of our recordings using wide-field microscopy and triggered dopamine release by photolysis of NPEC-DA ('caged' dopamine) with a flash of UV light in the brain slice. The cellular responses to uncaging were monitored in D1 and D2 MSNs with the cAMP biosensor Epac-S^{H150} (Fig. 2). A first uncaging event (1 μ M NPEC-DA) increased the cAMP signal in approximately half of the MSNs, consistent with the activation of the D₁ receptors in D1 MSNs (Fig. 2). In the absence of NPEC-DA, the flash of UV light triggered minimal changes in the biosensor signal. Since D₂ receptors are negatively coupled to cAMP production, intracellular cAMP levels were then increased selectively in D2 MSNs by applying A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, 1 μ M) in the presence of the A₁ antagonist PSB36 (100 nM). Once a steady-state cAMP level was reached in D2 MSNs, the effect of dopamine uncaging could be monitored simultaneously in D1 and D2 MSNs, in the form of transient cAMP responses of opposite directions, i.e. peaks in the D1 MSNs and troughs in the D2 MSNs (Fig. 2B and C). This second dopamine uncaging in the presence of CGS 21680 was used to quantify the dopamine effect on D1 and D2 MSNs. SKF-81297 (SKF, 100 nM) was used to elicit the maximal

D₁-dependent biosensor signal to serve as the reference for normalizing the D₁ response (Fig. 2C). The amplitude of the A_{2A} response to CGS 21680 was used as the reference for normalizing the D₂ response (Fig. 2C).

To test for protocol reproducibility within an experiment, dopamine uncaging was repeated several times in the same experiment, producing responses of similar amplitudes and time courses. The extent of dopamine uncaging from NPEC-DA was checked by uncaging 1 μ M NPEC-DA with increasing UV power: D₁ responses reached a saturation between 7.5 and 15 mJ; a power of 7.5 mW UV was used throughout this manuscript. The involvement of D₁-like and D₂-like receptors was verified pharmacologically. When dopamine was uncaged in the presence of the D₁-like receptors antagonist SCH-23390 (1 μ M), the cAMP

response in D₁ MSNs was suppressed whereas the D₂ MSNs responded normally. Similarly, the inhibition of D₂-like receptors with the antipsychotic drug haloperidol (100 nM) abolished the trough in cAMP level that followed dopamine uncaging in D₂ MSNs, while the D₁ peaks in D₁ MSNs remained unchanged. Inhibition of monoamine re-uptake with GBR-12783 (1 μ M) and desipramine (1 μ M) had no effect on baseline cAMP level nor on responses to transient dopamine.

Dopamine transients activate D₁ and D₂ receptors with similar efficacies

We then used uncaging to test the dose dependency of dopamine on the cAMP response in D₁ and D₂ MSNs. As in Fig. 2, our protocol included a first uncaging with 1 μ M

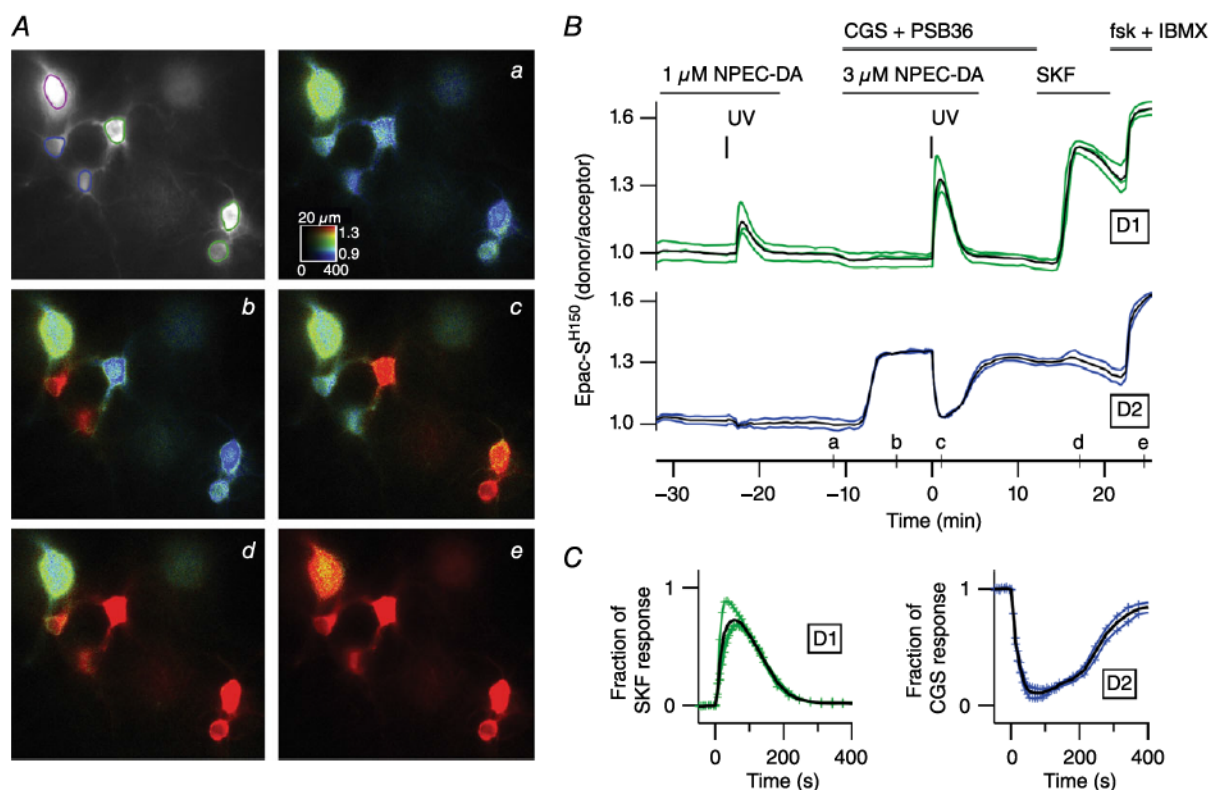


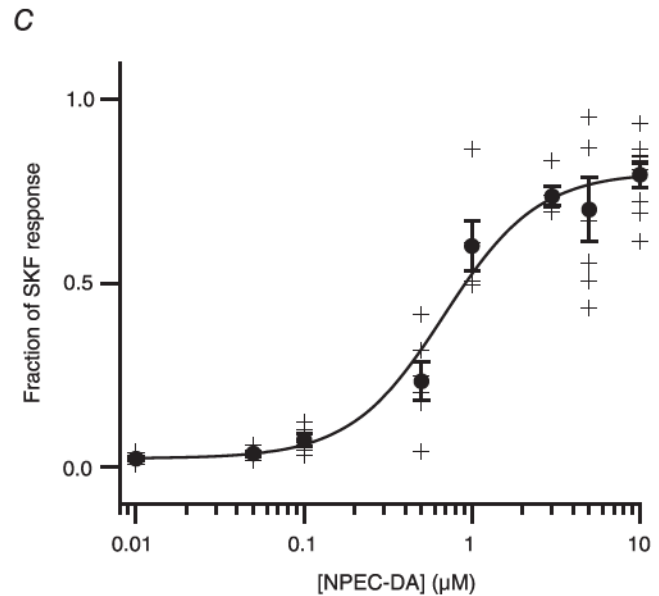
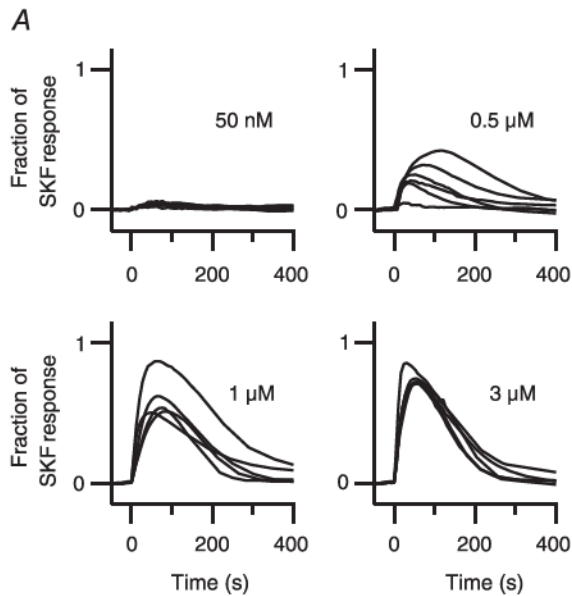
Figure 2. Transient dopamine induces positive and negative cAMP responses in D₁ and D₂ MSNs, respectively

A, wide-field imaging of the cAMP biosensor Epac-SH150 in the dorsal striatum. Raw fluorescence of the donor is displayed in grey and donor/acceptor fluorescence ratio is displayed in pseudo-colour. Images a–e show the ratio corresponding to the time points indicated on the graph in B. The large neuron (purple contour, top left) is a putative giant cholinergic interneuron. B, dopamine released from NPEC-DA (1 μ M) by UV uncaging generated a transient positive response in the D₁ MSNs (green traces), and no effect on basal cAMP levels in D₂ MSNs (blue traces). During the steady-state response to the A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, 1 μ M) in D₂ MSNs, uncaging (test dose of 3 μ M NPEC-DA) generated a second transient increase in the D₁ MSNs, and a trough in the D₂ MSNs. The D₁ receptor agonist SKF-81297 (SKF, 100 nM) was applied at the end of the experiment to determine the maximal D₁ response. The final application of forskolin (fsk, 13 μ M) and IBMX (200 μ M) revealed the saturating ratio level for each neuron. The A₁ receptor antagonist PSB36 (100 nM) was applied together with CGS 21680. C, the traces of these individual cells and their average ratio responses in the D₁ or D₂ MSNs are normalized with respect to the maximal D₁ and A_{2A} responses produced by SKF-81297 or CGS 21680, respectively. Black traces in B and C represent the averages.

NPEC-DA to reveal D1 MSNs, a recovery period of more than 10 min and a second uncaging with the tested dose of NPEC-DA. A single dose was tested in each experiment. The traces of all MSNs of a same type were averaged. In

D1 MSNs (Fig. 3A), the peak amplitude was quantified as a fraction of the response to SKF-81297 (SKF, 100 nM); in D2 MSNs (Fig. 3B), the negative cAMP response was quantified as a fraction of the steady-state level elicited

D1 MSNs



D2 MSNs

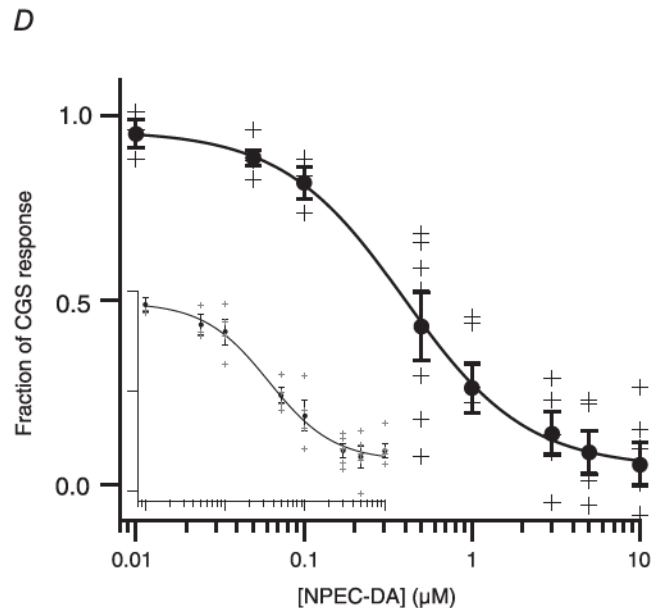
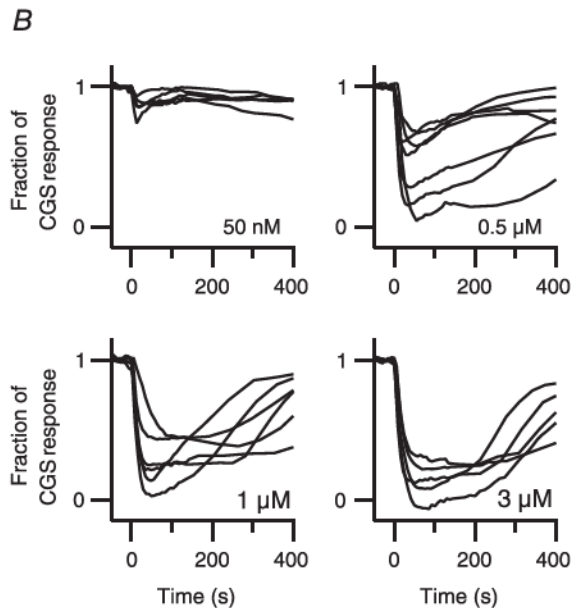


Figure 3. Transient dopamine regulates cAMP in D1 and D2 MSNs in a dose-dependent manner

The experiment presented in Fig. 2 was repeated with different doses of NPEC-DA (a single dose per experiment) in brain slices expressing the Epac-S^{H150} biosensor. Each trace represents the average response to dopamine uncaging for D1 MSNs (A) or D2 MSNs (B) in one brain slice. C, for D1 MSNs, the amplitude of the cAMP responses was normalized with respect to the response to SKF-81297 (100 nM); EC₅₀ was 0.68 μM. D, for D2 MSNs, responses were normalized to the level reached with CGS 21680 (1 μM) before uncaging; EC₅₀ was 0.39 μM. Inset (same units), a similar dose-response analysis was performed except that a low concentration of forskolin (63 nM) was used to increase cAMP to a steady-state level in D2 MSNs; EC₅₀ was 0.35 μM.

by the A_{2A} receptor agonist CGS 21680 (CGS, $1 \mu\text{M}$) measured before dopamine uncaging. These values were used to build the dose–response curves, with at least 5 independent experiments for each dose. In D1 MSNs, the D1 cAMP dose–response relationship was fitted to a Hill equation with an EC_{50} of $0.68 \mu\text{M}$ and Hill coefficient of 1.5 (Fig. 3C). The curve reached a plateau at 80% of the SKF response indicating that transient dopamine stimulation does not elicit maximal activation of the D_1 receptor. In D2 MSNs, the cAMP dose–response relationship was fitted to a Hill equation with an EC_{50} of $0.39 \mu\text{M}$ and Hill coefficient of 1.2 (Fig. 3D).

It was previously demonstrated that the binding of agonists or antagonists onto A_{2A} receptors decreases the affinity of D_2 receptors for dopamine through heterodimer interactions (Ferré *et al.* 1991, 2008; Vidi *et al.* 2008; Bonaventura *et al.* 2015), and we investigated whether this interaction affected dopamine efficacy in our conditions. Therefore, instead of stimulating A_{2A} receptors, we used a low concentration of forskolin (63 nM) to increase cAMP to a steady-state level that roughly matched the level obtained with A_{2A} receptor stimulation. Dopamine uncaging transiently decreased forskolin-induced steady-state cAMP levels. The depth of this cAMP trough was expressed as a fraction of the response to low forskolin. The dose–response relationship obtained with low forskolin was similar to that obtained with CGS (EC_{50} of $0.35 \mu\text{M}$ and Hill coefficient of 1.0; Fig. 3D inset). This suggests that our measurement of dopamine efficacy is independent of the A_{2A} – D_2 interaction. However, the maximal D_2 effect of transient dopamine only reached ~ 0.80 with low forskolin vs. ~ 1.0 with A_{2A} agonist, suggesting that a fraction of the adenylyl cyclases activated by forskolin remain out of reach for $G_{i/o}$ proteins.

Downstream effect of dopamine uncaging, measured at the level of PKA-dependent phosphorylation

Downstream of cAMP, we measured the efficacy of transient dopamine in affecting PKA-dependent phosphorylation with the same protocol as Fig. 2, except that the measurements were carried out with AKAR3 biosensor (Fig. 4). The AKAR3 biosensor is a PKA substrate, and, upon phosphorylation, a conformational change of the protein results in an increased FRET between donor and acceptor. This change is reversible upon dephosphorylation by phosphatases like PP1.

In D1 MSNs, increasing doses of NPEC-DA led to transient AKAR3 responses of increasing magnitude (Fig. 4A). The dose–response relationship was fitted to a Hill equation with an EC_{50} of $0.15 \mu\text{M}$ and a Hill coefficient of 1.3. This lower EC_{50} of dopamine on the biosensor AKAR3 compared to Epac- S^{H150} is consistent with PKA having a higher sensitivity for cAMP than Epac (Dostmann &

Taylor, 1991; Bos, 2003). Indeed, the higher sensitivity of the AKAR3 biosensor compared to Epac-based biosensors has already been reported (Castro *et al.* 2010, 2013; Polito *et al.* 2013) and fits with the observation that 100 nM SKF-81297 increases the AKAR3 signal to its maximal level, which is not found with Epac- S^{H150} . In D2 MSNs, the depth of the dopamine-induced troughs in PKA-dependent phosphorylation levels were modest, even at micromolar doses of NPEC-DA (Fig. 4B), revealing a profound imbalance between D1 and D2 MSNs in their integration of a same dopamine transient. For example, a $0.5 \mu\text{M}$ dose of NPEC-DA triggered a maximal peak response in D1 MSNs, whereas in D2 cells the CGS-induced steady-state was reduced by only 10%. These results show that transient dopamine is highly potent in increasing PKA-dependent phosphorylation in D1 MSNs, whereas in D2 MSNs, dopamine transients are much less efficient, despite the strong decrease in cAMP signal.

Experimentally constrained cAMP–PKA signalling models for D1 and D2 MSNs

The duration of D1-dependent AKAR response in our experiments is longer than what has been previously reported (Yagishita *et al.* 2014), which suggested that dopamine released by uncaging in our preparation might stay in the slice for tens of seconds, whereas phasic dopamine measured in response to burst firing of dopamine neurons, as observed in reward-learning paradigms, lasts for only a few seconds (Day *et al.* 2007). Thus, we wanted to explore with *in silico* simulations the cAMP–PKA response produced by dopamine inputs lasting a few seconds. To this end, we developed two separate experimentally constrained mass-action reaction-kinetic models of the dopamine-triggered signalling network in D1 and D2 MSNs (see Methods).

The modelled biochemical network for D1 MSNs includes the signalling processes triggered by the activation of D_1 receptor (Fig. 5A). D_1 receptor activates AC5, which then leads to an increase in cAMP and PKA activation (Fig. 5A). The modelled network includes the PKA-dependent phosphorylation of DARPP-32, which turns DARPP-32 into a potent PP1 inhibitor. The network also includes PDE10 as a cAMP sink, and other DARPP-32-related phosphorylation and dephosphorylation reactions (Fig. 5A). All these different interactions in the signalling network are represented as sets of biochemical reactions, and each biochemical reaction is modelled as an ordinary differential equation governed by mass-action kinetics (see Methods). The parameters in the model are the kinetic rate constants for individual reactions. This biochemical reaction model is a recalibrated version of a previously published signalling model (Nair *et al.* 2015). The networks also include Epac- S^{H150} and AKAR3 biosensors in order to

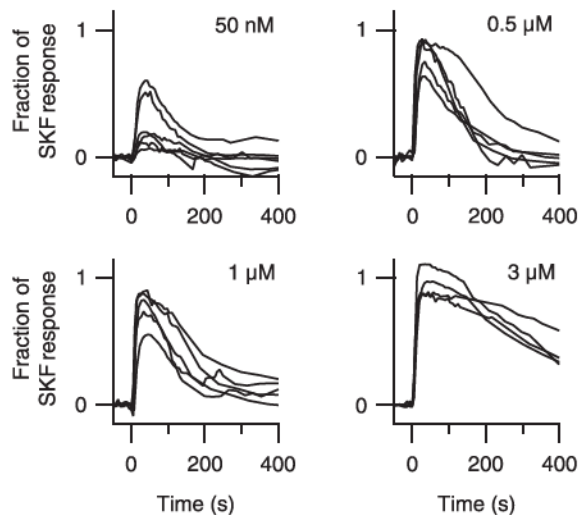
constrain various kinetic parameters using the observed Epac-S^{H150} and AKAR3 responses in the dopamine uncaging experiments. As the objective of including Epac-S^{H150} was to constrain the kinetic parameters using our biosensor measurements, it was only used during the model building process and not included in subsequent simulation experiments. On the other hand, along with constraining the model parameters, inclusion of AKAR3

in the network also served as a representative PKA substrate.

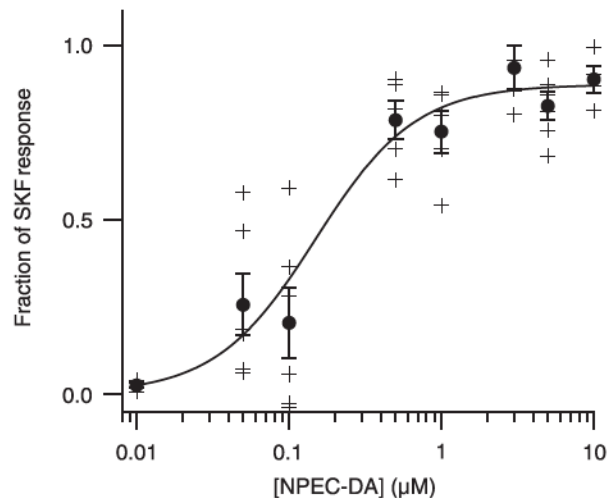
The basal cAMP levels in MSNs have been previously estimated around 30–100 nM (Polito *et al.* 2015). Thus, we first constrained the AC5 and PDE10 parameters such that the basal cAMP level was in this range. In addition, the reaction parameters related to cAMP production and degradation, along with the

D1 MSNs

A

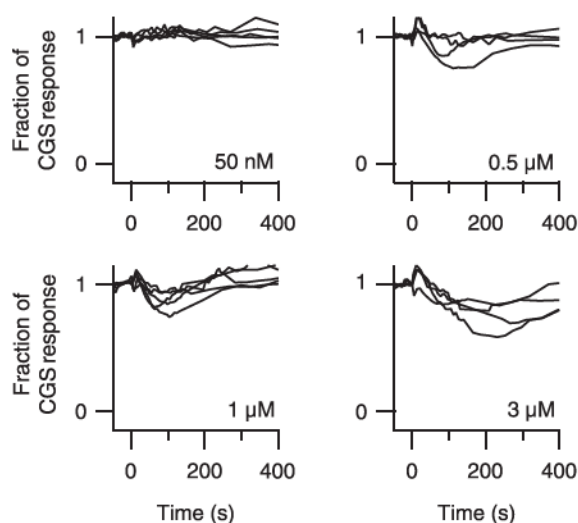


C



D2 MSNs

B



D

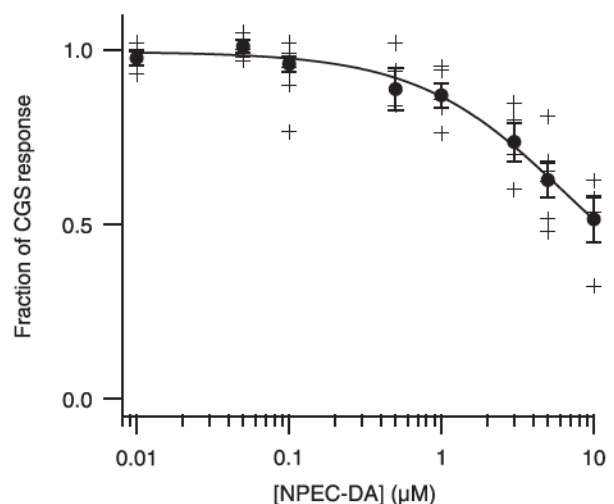


Figure 4. Effect of transient dopamine on PKA-dependent phosphorylation in D1 and D2 MSNs

Similar experiments as in Fig. 3 were performed with the PKA biosensor AKAR3. Each trace represents the average response to dopamine uncaging for D1 MSNs (A) or D2 MSNs (B) in one brain slice. For D1 MSNs, AKAR3 responses were normalized with respect to the response to SKF-81297 (100 nM); for D2 MSNs, responses were normalized to the level reached with CGS 21680 (1 μ M) before uncaging. The maximal value of the transient AKAR3 response was used to build a dose-response curve for D1 MSNs (C) and D2 MSNs (D). Fitting the data to a Hill equation gives an EC₅₀ of 0.15 μ M for D1 MSNs.

receptor and G-protein activation–inactivation cycle, were also constrained to produce cAMP responses similar to those observed experimentally when recording Epac-S^{H150} signal in response to 3 μ M dopamine uncaging (Fig. 5B). Downstream of cAMP, the PKA activation parameters were constrained using previously published

cAMP dose-dependent activation of the PKA subunit RII β (Dostmann & Taylor, 1991) and further refined taking in consideration the phosphorylation (PKA) and dephosphorylation (PP1) parameters of the AKAR3 response to 1 μ M dopamine uncaging (Fig. 5C). The AKAR3 phosphorylation/dephosphorylation kinetic was

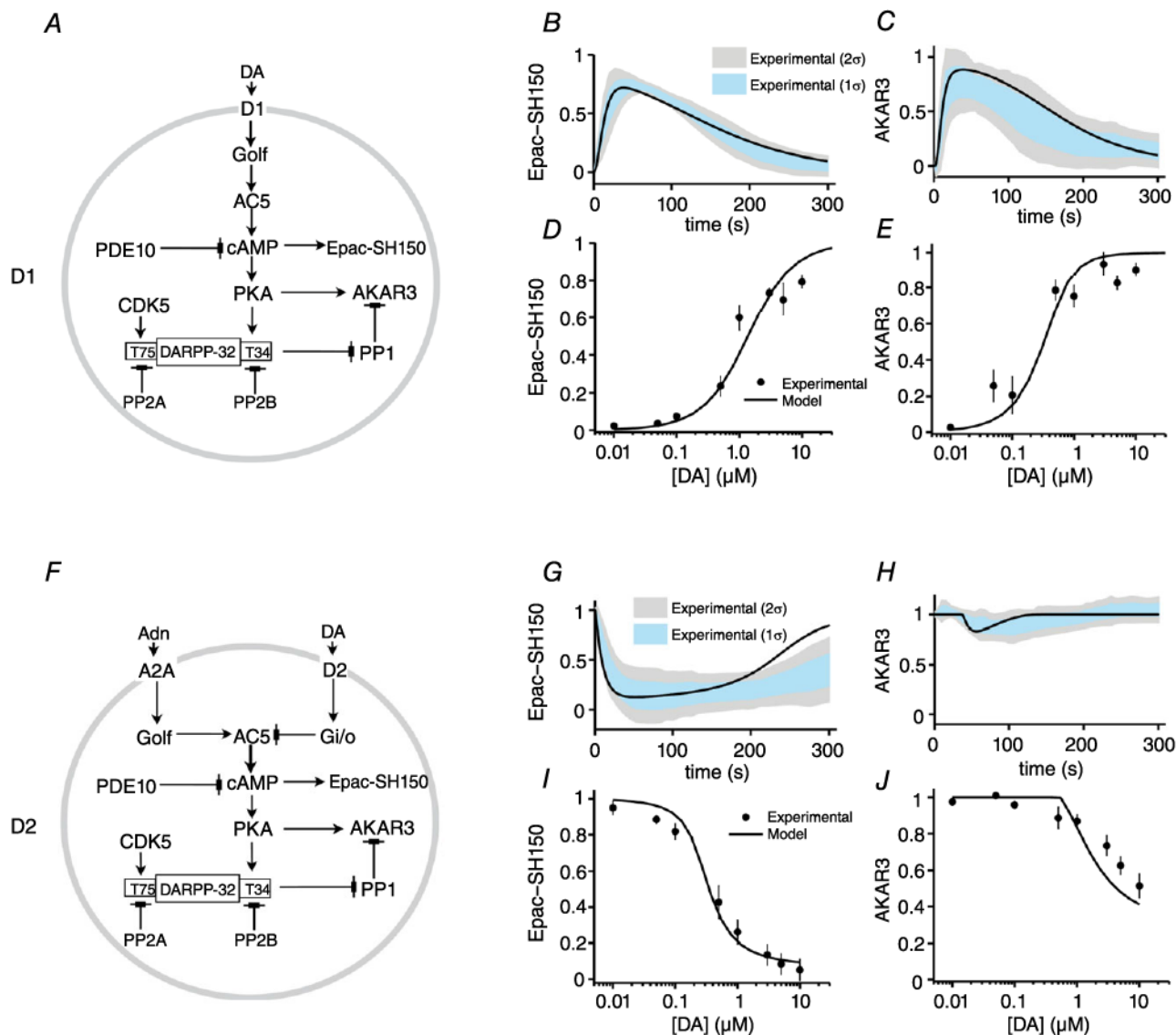


Figure 5. Modelled D1 and D2 MSN signalling network and fitting to experimental data

A, modelled signalling network for dopamine-dependent signalling in D1 MSN. B and C, comparison of D1 MSN model simulation and measured response at the level of Epac-S^{H150} in response to uncaging of 3 μ M dopamine (B) and at the level of AKAR3 phosphorylation in response to uncaging of 1 μ M dopamine (C). The shaded regions indicate the first and second standard deviations of the measured responses. Dopamine uncaging is simulated using an instantaneous increase in DA concentration to a given amplitude followed by an exponential decay (see Methods). D and E, comparison of the simulated and measured Epac-S^{H150} (D) and AKAR3 (E) responses with varying concentrations of uncaged dopamine. F, modelled signalling network for dopamine-dependent signalling in D2 MSN. The signalling core is the same as in D1 model except for the receptors. G and H, comparison of D2 model simulation and measured response at the level of Epac-S^{H150} in response to uncaging of 3 μ M dopamine (G) and at the level of AKAR3 phosphorylation in response to uncaging of 1 μ M dopamine (H). I and J, comparison of dopamine dose-dependent response between D2 model simulations and measurement at the level of Epac-S^{H150} (I) and AKAR3 (J). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

also constrained by known dynamics of striatal AKAR response produced by transient dopaminergic stimulation (Yagishita *et al.* 2014). The D₁ receptor binding parameters were then further constrained to match the model output with the observed dose–response for dopamine uncaging on Epac-S^{H150} response (Fig. 5D) and AKAR3 phosphorylation (Fig. 5E).

Since DARPP-32 plays an important role in transient dopamine response in D1 MSNs at the level of the PKA:PP1 equilibrium (Castro *et al.* 2013), it was also included in the model downstream to PKA (Fig. 5A). PKA phosphorylates DARPP-32 at Thr-34, which turns DARPP-32 into a potent inhibitor of PP1 (Hemmings *et al.* 1984). DARPP-32 is also phosphorylated at Thr-75 by CDK5 (Bibb *et al.* 1999). As in previous modelling studies (Nair *et al.* 2015, 2016), the phosphorylation and dephosphorylation reactions at these two residues were constrained using the estimated basal (Nishi *et al.* 1997; Bibb *et al.* 1999; Bateup *et al.* 2008) and stimulated (Nishi *et al.* 2000; Bateup *et al.* 2008) levels of phosphorylated residues.

The reaction-kinetic model for D2 MSNs was built by modifying the D1 model because the core signalling modules are identical except for the receptors (Fig. 5F). Thus, we used the same biochemical reactions and respective kinetic rate parameters in the common signalling core of the two models. The parameters related to A_{2A} and D₂ receptors were constrained to reproduce the observed dynamics of Epac-S^{H150} (Fig. 5G) and AKAR3 (Fig. 5H) signals produced by dopamine uncaging. The model also reproduces the dopamine uncaging dose-dependent response of Epac-S^{H150} (Fig. 5I) and AKAR3 (Fig. 5J).

It has been previously indicated that the basal level of phospho-Thr-34 DARPP-32 is higher in D2 MSNs than in D1 MSNs (Nishi *et al.* 1997; Bateup *et al.* 2008; Polito *et al.* 2015). Since we have assumed the kinetic parameters for all biochemical reactions to be identical in D1 and D2 models, we accommodated this higher basal level of phospho-Thr-34 in the D2 model by decreasing the amount of PP2B to half the amount used in the D1 model. This reduces the efficacy of Thr-34 dephosphorylation in the D2 model compared to the D1 model. This reduced dephosphorylation efficacy aligns well with previously published observations regarding the imbalance in the DARPP-32 phosphorylation (Nishi *et al.* 2008) or DARPP-32-mediated PP1 inhibition between D1 and D2 MSNs (Polito *et al.* 2015). The modelled D2 signalling network also reproduces the previously published observation on the effect of D₂ receptor saturation upon DARPP-32 phosphorylation (Bateup *et al.* 2008).

In order to constrain the model parameters using our Epac-S^{H150} and AKAR3 time series and dose response data, we had to assume that dopamine uncaging resulted

in an instantaneous increase in dopamine which subsequently decayed exponentially with a time constant of ~90 s. This suggested that dopamine remained available to act on receptors for some time after uncaging. We experimentally tested dopamine clearance using a fast microperfusion system to apply the D₁-like receptor antagonist SCH-23390 (1 μ M) simultaneously with uncaging: while dopamine uncaging triggers an immediate release of dopamine in the brain slice, the diffusion of the antagonist from the surface to the depth of the brain slice where neurons are imaged takes at least 10 s (Nicholson, 2005; Gervasi *et al.* 2007). Compared to the first control D₁ response, SCH-23390 strongly reduced the duration of the second response, stopping it before it reached its peak (Fig. 6A and B). The model output matches the measurements quite well (Fig. 6C), which supports our assumption regarding the slow clearance of uncaged dopamine, and indicates that the clearance rate used in the model building process is close to the actual rate in brain slices. Furthermore, diffusion out of the uncaging volume was tested by monitoring the decay of fluorescein fluorescence in a brain slice after its release from caged fluorescein in the same experimental conditions as for our dopamine uncaging experiments. Fluorescein fluorescence decayed with a time constant of 109 s, consistent with the value obtained for dopamine during the model fitting. Together with the lack of effect of dopamine re-uptake inhibitors, these data show that the decay of uncaged dopamine in young brain slices is mainly driven by diffusion out of the imaging volume and therefore slower than in other preparations (Lee *et al.* 2002).

One concern while using biosensors is that a high amount of biosensor could introduce buffering effects and readout artefacts. We simulated whether different concentrations of Epac-S^{H150} or AKAR3 resulted in consistent responses to uncaging protocols using the D1 and D2 models. The simulations indicated that the biosensor responses are robust in a wide range of biosensor concentrations (Fig. 6D).

D1 and D2 model simulation with brief dopamine durations

We used the experimentally constrained D1 and D2 signalling network models to explore the effects of brief dopamine pulses resulting from phasic activity in dopaminergic neurons on cAMP–PKA signalling in MSNs (Fig. 7). A tonic A_{2A} activity was included for the simulations of the D2 network in order to observe the D₂ receptor-dependent effect on cAMP. We set the tonic A_{2A} activity to produce ~50% of the maximum A_{2A} receptor-induced cAMP elevation. All D2 model simulations for the rest of the study were done with this tonic A_{2A} activity. Both models were simulated with

a dopamine signal of rectangular shape with varying durations and amplitudes, and the effect was inspected in D1 and D2 MSNs at the level of intracellular cAMP (Fig. 7A and D), PKA activation (Fig. 7B and E) and PKA/phosphatase substrate (AKAR, in this case) phosphorylation level (Fig. 7C and F). As expected, transient dopamine inputs in D1 MSNs produced an increase in free intracellular cAMP through the activation of D₁ receptors. However, for dopamine amplitudes lower than 1 μM , this increase in free cAMP was negligible compared to that produced by saturating D₁ receptors (Fig. 7A). Larger cAMP responses were obtained in the micromolar range and these responses also depended on the

duration of the transient input (Fig. 7A). In contrast, D₂ signalling system appeared to be more sensitive to brief dopamine transients (Fig. 7D). The cAMP levels decreased in response to transient dopamine inputs in the D₂ model simulations, due to transient activation of the D₂ receptors. Unlike the D₁ model, even a brief dopamine input with a sub-micromolar amplitude (around 0.2 μM) produced a large decrease in cAMP in the D₂ model simulations (Fig. 7D). Moreover, the relation between dopamine amplitude and cAMP decrease appears to be quite steep: while a dopamine transient of 0.1 μM produced negligible decrease in cAMP, a transient of 0.5 μM could reduce the cAMP level down to its minimum possible level (Fig. 7D).

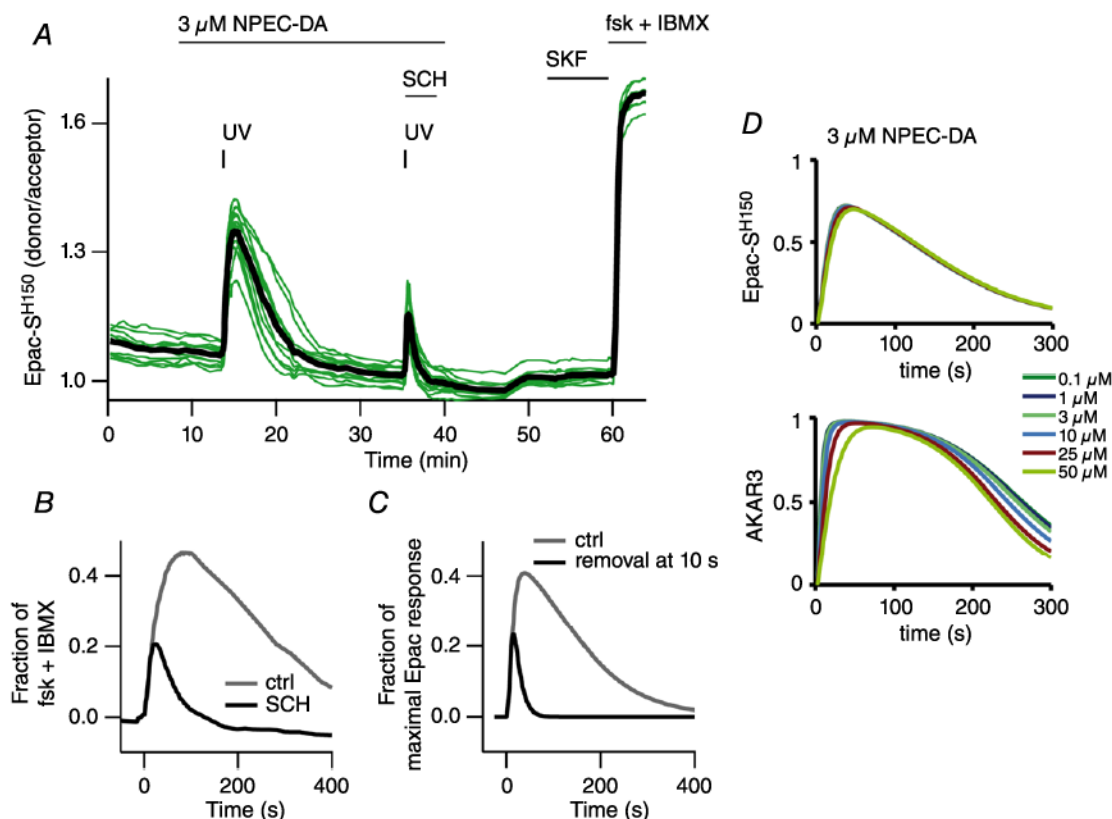


Figure 6. Dopamine remains in the brain slice for minutes after uncaging

A, a brain slice expressing the Epac-SH¹⁵⁰ biosensor was imaged with wide-field microscopy. A first uncaging of NPEC-DA (3 μM) was performed to produce a control cAMP response in D1 MSNs. After recovery, a second similar uncaging was performed, while the D₁ antagonist SCH-23390 (SCH, 1 μM) was applied at the same time with a fast perfusion system. In the presence of SCH-23390, the cAMP response appeared of smaller amplitude and duration. Subsequent application of SKF-81297 (SKF, 100 nM) showed no effect because D₁ receptors were still blocked by SCH-23390. B, overlaid traces of the two uncaging episodes shown in A. In this experiment, while the effect of UV uncaging is instantaneous, diffusion of the antagonist from the surface of the slice to the in-depth imaged neurons requires an additional diffusion time. SCH-23390 was thus able to shorten the response to dopamine uncaging, indicating that dopamine is still activating D₁ receptors minutes after having been released in the brain slice. C, the same experiment was simulated, with control uncaging and with dopamine being removed 10 s after release. D, biosensor concentration has little effect on response amplitude. Simulations using the D1 MSN model with different concentrations of the Epac-SH¹⁵⁰ or AKAR3 biosensors, and dopamine stimuli mimicking the dopamine uncaging experiment. The dopamine stimulus corresponds to an instantaneous increase in dopamine concentration to the indicated concentration with an exponential decay with a 90 s time constant (see Methods). Differences in logged responses became significant only for biosensor concentrations of 50 μM and above. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

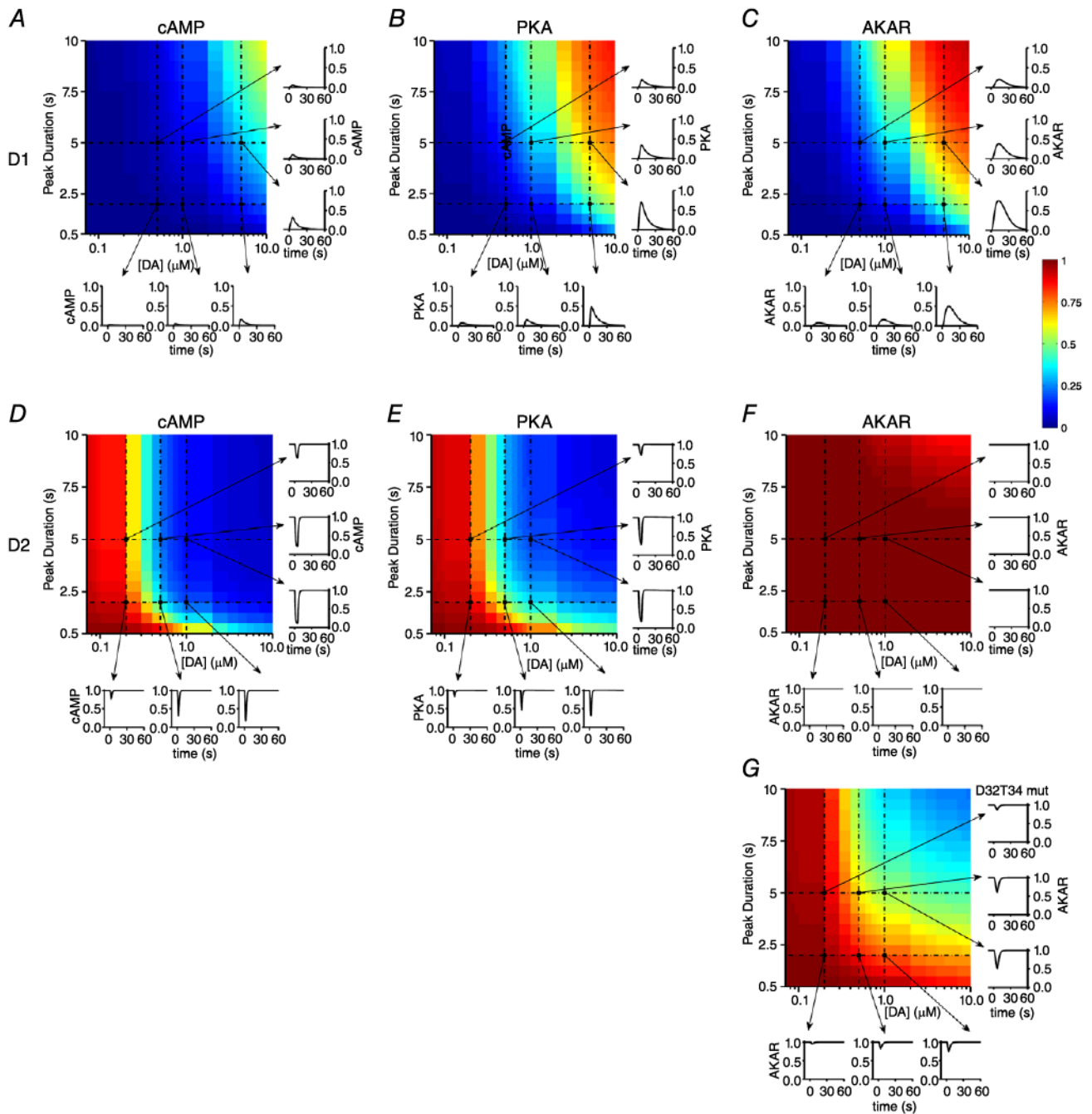


Figure 7. Simulations of D1 and D2 MSN models with brief dopamine transients

Responses at the level of cAMP (A), PKA (B) and AKAR (C) for the D1 MSN model simulations with different amplitude and duration of dopamine input. Each heat map represents the maximal value of the response produced by dopamine input of the indicated amplitude and duration. Colours correspond to the shown colour bar. The response values are normalized between 0 and 1, where 0 corresponds to the response in absence of any receptor stimulation and 1 corresponds to the response produced by saturating activation of D₁ receptor. The traces show the time course of the responses for selected dopamine input levels (0.5 μM , 1.0 μM and 5.0 μM) and durations (2 s and 5 s). Responses at the level of cAMP (D), PKA (E) and AKAR (F) for the D2 MSN model simulations with different amplitude and duration of dopamine input. G, same as F, except that DARPP-32 bears a Thr34 lack-of-function mutation. The heat map represents the minimal value of the response produced by dopamine input. The response values are normalized between 0 and 1, where 0 corresponds to the response in absence of any receptor stimulation and 1 corresponds to the response produced by the activation of $\sim 50\%$ of A_{2A} receptor. The traces show the time course of the response for selected dopamine input level (0.2 μM , 0.5 μM and 1.0 μM) and duration (2 s and 5 s).

This is unlike the simulation output for the D1 model where the relation between dopamine amplitude and cAMP effect was more gradual (Fig. 7A). Moreover, the cAMP responses in the D2 model simulations appeared to be largely insensitive to the duration of the transient dopamine input, the effect being similar for all transients of 1 s duration and more (Fig. 7D).

The response at the level of PKA activation closely followed the pattern observed for cAMP response in both D1 and D2 models (Fig. 7B and E). However, in the D1 model, the relation between the amplitude of transient dopamine input and level of normalized PKA activation was left-shifted compared to normalized cAMP levels (compare Fig. 7A and B). Similarly, the relation between the duration of transient dopamine and PKA appeared to be down-shifted compared to cAMP activation. Thus, in D1 MSNs, dopamine transients in the lower micromolar range and with short duration could produce significant PKA activation even though the level of cAMP, compared to maximum possible level, may be modest. In the D2 model, the relation between dopamine amplitude and PKA activation is less steep than its cAMP counterpart (compare Fig. 7D and E).

Downstream of PKA activity, we also looked at how the level of AKAR phosphorylation responded to brief dopamine transients. We considered AKAR as a proxy for general PKA and phosphatase substrate. The response at the level of AKAR phosphorylation for the D1 model closely followed the PKA activation response, suggesting that brief dopamine transients of micromolar amplitude could produce a significant phosphorylation of PKA substrates (Fig. 7C). However, for the D2 model, there was an unexpected divergence between responses at PKA and AKAR level. There was no significant effect of transient dopamine input on AKAR phosphorylation, even for high dopamine amplitudes and long durations (Fig. 7F), contrary to the PKA response upstream of AKAR which is sensitive to even sub-micromolar dopamine levels (compare Fig. 7F with E).

Since active PKA itself appears to be quite responsive in D2 model simulations (Fig. 7E), a possible reason for the counter-intuitive AKAR response could be the inhibition of PP1 mediated by PKA-dependent DARPP-32 phosphorylation at Thr-34, as already described with biosensor imaging (Castro *et al.* 2013; Polito *et al.* 2015). Therefore, we assessed the role of DARPP-32-mediated PP1 inhibition on the AKAR response of D2 MSNs using a D2 model variant (D32T34 mut) in which the PP1 inhibition by the Thr-34 was turned off. The elimination of DARPP-32-mediated PP1 inhibition allowed for a reduction in AKAR phosphorylation level for some combinations of dopamine amplitudes and durations (Fig. 7: compare G with F). This indicates that DARPP-32 plays an important role in preventing the dephosphorylation of PKA substrates following a

dopamine transient in D2 MSNs. However, even in the absence of DARPP-32-mediated PP1 inhibition, the AKAR reduction produced by brief (e.g. less than 5 s) dopamine peaks in D2 MSNs is much less pronounced than the PKA reduction (compare Fig. 7G with E). This is because the time window of diminished PKA activity resulting from dopamine transients, in this case, is too short compared to PP1-mediated AKAR dephosphorylation kinetics.

To summarize, both D1 and D2 signalling systems can sense brief dopamine inputs, which are subsequently transformed into opposing intracellular changes at the level of cAMP and PKA. At both levels, D2 MSNs appear to be more sensitive than D1 MSNs, in terms of amplitude and duration of the dopamine input. However, at the level of AKAR, D2 MSNs remain unresponsive to brief dopamine transients, due to the strong PP1 inhibition exerted by DARPP-32.

Simulations indicate that D2 MSNs can sense a dip in the tonic level of dopamine

Aversive stimuli or the omission of an expected reward result in a pause in dopamine neuron activity, and thus in a transient dip in striatal dopamine level. We used our models to explore the effects of transient dips in dopamine level on cAMP–PKA signalling. To this end, both D1 and D2 models were simulated with varying levels of basal dopamine concentration, and a dip in this tonic dopamine level for different durations (Fig. 8). As with the previous simulations, the D2 model was simulated with a tonic A_{2A} activity set to produce ~50% of the maximum possible A_{2A} -dependent cAMP level.

Figure 8A shows the effect of dips of different durations at different basal dopamine levels on cAMP in the D1 model. The dip duration of 0 s represented a scenario where there was no dip, thus representing the steady-state level of cAMP for different basal dopamine levels. The steady-state level of cAMP increased with the level of basal dopamine, and became significant when reaching the micromolar range (Fig. 8A, dip duration = 0 s). When basal dopamine was in the sub-micromolar range, there was little intracellular cAMP to start with, and therefore a dopamine dip had no effect on cAMP levels (Fig. 8A, left side). With basal dopamine in the micromolar range, a dip in dopamine led to a clear reduction in the level of cAMP (Fig. 8A, right side). The D1 model followed the same pattern at the level of PKA activity, although the responses were slightly left-shifted due to the high sensitivity of PKA to cAMP (Fig. 8B, dip duration = 0 s). Thus, the cAMP level reached with 1 μ M basal dopamine was modest but sufficient to moderately activate PKA (compare Fig. 8A and B; dip duration = 0 s). Similar to cAMP, there was no effect of a dopamine dip in the range where the steady-state PKA was low to start with (Fig. 8B, left half). An effect of the dip appeared in a

higher range of basal dopamine, and required the dip to last at least 5 s (Fig. 8B, right half). Thus, in order to be effective in the D1 signalling system, a dopamine dip should be long enough to accommodate the deactivation kinetics of the downstream effector system, a kinetics determined by G-protein inactivation, cAMP degradation and PKA inactivation. Basal dopamine was more effective on AKAR phosphorylation level than on PKA (Fig. 8C, dip duration = 0 s; compare with Fig. 8B): even a sub-micromolar level of basal dopamine led to a highly phosphorylated state, which is consistent with the high

sensitivity of AKAR to PKA-mediated phosphorylation. In this condition, a dopamine dip even of long duration had negligible effect on AKAR phosphorylation (Fig. 8C).

In the D2 model, the A_{2A} -mediated steady state level of cAMP was decreased in the presence of sufficient basal dopamine, via the activation of D_2 receptors (Fig. 8D, dip duration = 0 s): there was no significant effect at very low basal dopamine on the cAMP levels, whereas the cAMP level was strongly reduced by dopamine concentrations in lower sub-micromolar range. In this regime, since the cAMP signal was strongly inhibited, a transient

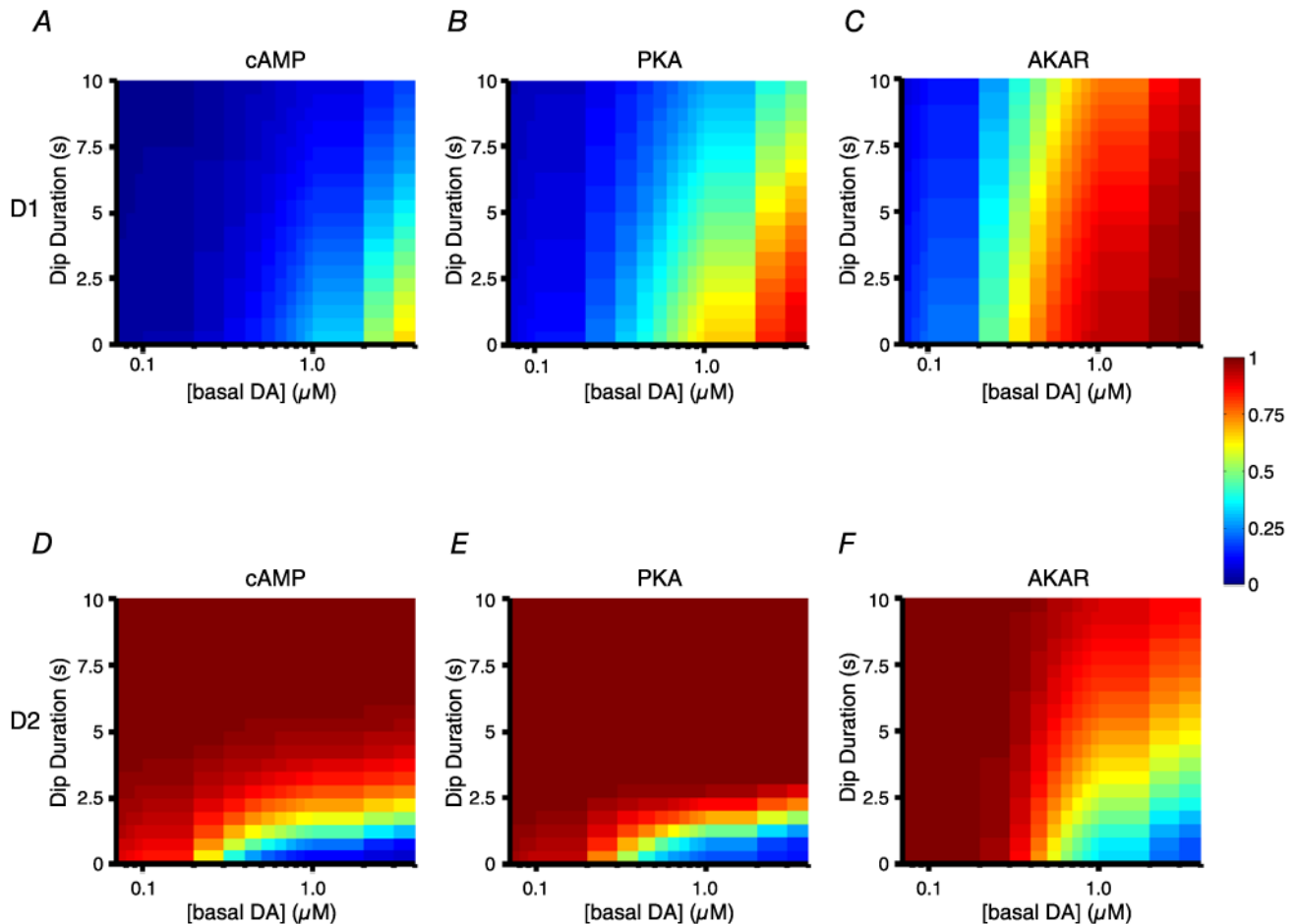


Figure 8. Simulations of D1 and D2 MSN models with varying levels of tonic dopamine and dips in this tone level

Responses at the level of cAMP (A), PKA (B) and AKAR (C) for the D1 MSN model simulations with varying basal (tonic) dopamine levels (upper 1D heat map) and the effect of a dopamine dip (lower 2D heat map) in these different basal level conditions. Each heat map represents the maximal value of the response produced by the dopamine dip. Colours correspond to the shown colour bar. The response values are normalized between 0 and 1, where 0 corresponds to the minimal response in the absence of any receptor stimulation and 1 corresponds to the response produced by a maximal activation of the D_1 receptor. The relation between basal response and tonic dopamine level is displayed as a heat map using the same colour map as the dip response in order to facilitate comparison between the basal response and the effect of dip on top of that. Responses at the level of cAMP (D), PKA (E) and AKAR (F) for the D2 MSN model simulations with varying basal dopamine levels (upper 1D heat map) and the effect of a dopamine dip (lower 2D heat map) in these different basal level condition. In this case, the heat map represents the minimal value of response. The response values are normalized, 0 corresponding to the minimal response in absence of any receptor stimulation and 1 corresponding to the maximal response produced by the activation of ~50% of A_{2A} receptor.

lack of dopamine could allow for cAMP signalling to recover a high level. Indeed, simulation reported that brief dopamine dips (1–2 s) resulted in a strong cAMP increase (Fig. 8D, right part). On the other hand, a dopamine dip had no effect if the basal dopamine was lower because in these conditions the starting level of cAMP was already around its maximum value (Fig. 8D, left part).

Simulations showed similar effects at the level of PKA activity: a basal dopamine level in lower sub-micromolar exerted a strong reduction in the PKA activity (Fig. 8E, dip duration = 0 s). Again, dips with a short duration (1–2 s) led to efficient PKA activation. The effects on AKAR were similar to those simulated with PKA, except that the basal dopamine level producing an effect was slightly right shifted (Fig. 8F, dip duration = 0 s). Similar to the PKA response, in a condition of sub-micromolar basal dopamine, a dip led to increased AKAR phosphorylation (Fig. 8F). However, the relation between the strength of AKAR response and dip duration appeared to be more graded than the relation between PKA activation and dip duration (Fig. 8F). This led to a possibility that the dip duration may also have an encoding role as it has been previously hypothesized (Bayer *et al.* 2007; Nair *et al.* 2015).

In summary, while D1 MSNs appeared poorly suited to detect a dip in basal dopamine in a physiologically relevant range of dopamine concentration, D2 MSNs were capable of responding to dips of short durations, in a range of basal dopamine which is compatible with physiological conditions, and at all levels of the signalling cascade.

Discussion

It is commonly accepted that striatal D₁ receptors have low affinity for dopamine compared to D₂ receptors, leading to the idea that D₂ receptors are activated by the tonic dopamine levels under basal conditions, while D₁ receptors sense the phasic dopamine signals. The data we obtained using biosensor imaging on MSNs in brain slices challenge this assumption by showing that the EC₅₀ of transient dopamine on D₁ and D₂ receptors differ only by a factor of two. These measurements, complemented with numerical simulations, indicate that both D1 and D2 MSNs can integrate a brief dopamine transient into a change in cAMP. However, in D2 MSNs, brief dopamine transients fail to affect the phosphorylation level of AKAR, a biosensor protein that reports the PKA/phosphatases equilibrium. In addition, simulations suggest that D2 MSNs can work in a 'tone sensing' mode, where they successfully respond to the transient interruptions (dips) in the tonic release of dopamine associated with the omission of expected rewards. The switch between the different detection modes for D2 MSNs may result from changes in tonic dopamine, adenosine, as well as from a number of other neuromodulatory cues that remain to be studied.

Our approach with biosensor imaging and transient stimulation with dopamine uncaging provided similar EC₅₀ values for cAMP responses in D1 and D2 MSNs, in the sub-micromolar range. While these values are in accordance with previously published measurements in pituitary homogenates or embryonic neuronal cultures (Enjalbert & Bockaert, 1983; Weiss *et al.* 1985), they strongly depart from several other studies, in particular for the D₂ receptor, where published efficacies range from nanomolar to micromolar (Albert *et al.* 1990; Schoffelmeer *et al.* 1994). Indeed, both D₁ and D₂ receptors exhibit high and low affinity states, and the proportion between these states critically depends on intracellular GTP levels and on the extent of receptor to G-protein pre-coupling (Richfield *et al.* 1989; Waelbroeck, 1999). The ternary complex model of receptor G-protein interaction postulates that the receptor affinity is higher when G-protein is pre-coupled to the receptors. G_{i/o} proteins, in particular, have been noted to exist as a pre-coupled complex with the receptor even in the absence of ligand (Bünemann *et al.* 2003). A low level of GTP could shift the equilibrium towards the high affinity receptor–G-protein complex (Hulme & Trevethick, 2010) and this parameter remains difficult to control in many experimental preparations. The density of receptors at the membrane may also affect efficacy measurements: our *in silico* simulations show the critical importance of this factor, which is hard to control in heterologous expression systems. Efficacy also depends on the output level which is considered (Kenakin, 2013) and our data indeed show a lower EC₅₀ of dopamine on PKA-dependent phosphorylation than on cAMP in D1 MSNs. The opposite effect is seen in D2 MSNs, with dopamine efficacy being highest on cAMP, then decreasing at the level of PKA-dependent phosphorylation, and decreasing even more for G-protein coupled potassium (GIRK) channel (Marcott *et al.* 2014). This is consistent with *in silico* simulations which showed that D₂ receptors required high levels of dopamine for G_{βγ} signalling on GIRK channels (Nair *et al.* 2015). Another contributing factor may be slow adaptations of receptor efficacy and signalling cascade during the course of long dopamine applications. The D₁ receptor strongly desensitizes (Dumartin *et al.* 2000) with a half-decay time of ~7 min (Gardner *et al.* 2001), inducing a twofold decrease in efficacy and reducing the maximal cAMP production (Kim *et al.* 2004). Symmetrically, the D₂ receptor displays a heterologous sensitization (Watts & Neve, 1996; Watts *et al.* 1998). Altogether, these data suggest that sustained dopamine applications could profoundly affect dopamine efficacy on D₁ and D₂ receptors. Such effects are circumvented with dopamine uncaging, since the rise of dopamine level occurs within less than a second and decays in about 100 s.

The integrative action of the signalling cascade leads to the emergence of more complex properties that

determine what type of dopamine signal can be sensed, and computational modelling is critical to understand these complex properties. Our data fit with the widely accepted notion that D1 MSNs are detectors of phasic dopamine. D1 MSNs indeed showed large responses to dopamine transients at the level of both cAMP and PKA-dependent phosphorylation, consistent with a highly efficacious transduction system geared for sensing dopamine transients (Castro *et al.* 2013). In contrast to D1 MSNs, D2 MSNs showed an unexpected complexity in the integration of dopamine transients: the traditional view is that D₂ receptors sense tonic dopamine, but this is contradicted by more recent data. Our data, as well as previous recordings with GIRK channels (Marcott *et al.* 2014), show that D2 neurons can sense transient dopamine in a high concentration range. *In vivo*, D₂ receptors in MSNs have also been shown to mediate the psychomotor effects of cocaine, further supporting their role in the striatal response to high dopamine levels (Kharkwal *et al.* 2016). Yet, contrasting with the high cAMP responsiveness to brief dopamine transients, dopamine had little effect in decreasing the phosphorylation level in D2 cells, which is in line with the commonly accepted unresponsiveness of D2 MSNs to phasic dopamine. Our data thus suggest that D2 MSNs present a differential responsiveness to phasic dopamine: G_{i/o}- and cAMP-dependent effectors such as G-protein coupled channels, cyclic-nucleotide gated channels and Epac proteins would selectively respond to phasic dopamine, whereas PKA targets, like NMDA receptors, synaptic proteins, PKA-regulated ion channels or nuclear proteins could remain insensitive.

Our simulations highlight DARPP-32 as a mediator of the unresponsiveness of D2 MSNs to transient dopamine peaks at the level of PKA/PP1 substrates. The DARPP-32 phosphorylation produced by A_{2A} receptors results in a strong inhibition of PP1. A transient dopamine input may only produce an effect if the time window of reduced PKA is long enough to allow DARPP-32 Thr-34 dephosphorylation and subsequent PP1 disinhibition. The computational models used in this study indicate that this disinhibition of PP1 could be particularly slow in D2 MSNs due to relatively weak dephosphorylation pressure on DARPP-32. This would be consistent with previous observations reporting a higher PKA-dependent phosphorylation of DARPP-32 in D2 MSNs compared to D1 MSNs (Nishi *et al.* 2008). This difference between D1 and D2 MSNs certainly accounts for the efficient phosphorylation of several PKA targets in D2 MSNs, such as the GABA_A receptors (Janssen *et al.* 2009) or histone H3 protein (Polito *et al.* 2015), even for small elevations in cAMP. As DARPP-32 is involved in the temporal aspects of signal integration at various downstream effectors (Castro *et al.* 2013; Polito *et al.* 2015; Nair *et al.* 2016), it would be interesting to see how these neuron-specific differences could affect such integrative processes.

The detection mode of D2 MSNs significantly differs depending on the tonic dopamine levels. Very low levels of tonic dopamine result in no significant inhibition of cAMP–PKA signalling and, in this configuration, cAMP in D2 MSNs can decrease in response to transient dopamine peaks. On the other hand, if tonic dopamine is high enough to suppress cAMP under basal conditions, then a dopamine peak cannot produce a further cAMP reduction. However, a dip in dopamine tone would result in an increase in cAMP, as previously predicted (Dreyer *et al.* 2010; Nair *et al.* 2015). D2 MSNs may thus be well suited for sensing the transient interruptions in tonic release of dopamine that are associated with the omission of expected rewards. This effect requires the activity of functionally coupled G_{olf}-dependent counterparts: if there is no underlying G_{olf}-mediated activity, neither a dopamine peak nor a dopamine dip will produce a D₂-dependent cAMP response. A_{2A} is one important G_{olf}-coupled receptor, but a number of other neuromodulatory processes could play a similar role.

Basal dopamine levels vary over a wide range, from few tens of nanomolar to sub-micromolar range (Kulagina *et al.* 2001; Chen & Budygin, 2007; Atcherley *et al.* 2015). At nanomolar dopamine level, both D1 and D2 MSNs can detect a transient dopamine peak. As the ambient dopamine level increases, PKA-dependent phosphorylation level increases in D1 MSNs, which progressively blunts responses to dopamine peaks, whereas the cAMP signalling level remains responsive. In parallel, D2 MSNs lose their sensitivity to dopamine peaks but may then respond to transient dips in ambient dopamine levels, thus switching from peak to dip detection mode. Higher tonic dopamine levels, such as those obtained with drugs of abuse (Di Chiara & Imperato, 1988; Heien *et al.* 2005; Covey *et al.* 2013), would strongly activate D₁ and D₂ receptors, which thus appear as complex detectors of dopamine signals, integrating both concentration and temporal parameters.

In the case of D2 MSNs, the importance of the parameters coupling the D₂ receptor and G_{i/o} proteins can be inferred from the model. For the cAMP signal in D2 MSNs to respond to a dopamine dip, the D₂-associated G_{i/o} protein should have a fast GTPase activity: if the deactivation of G_{i/o} is not fast enough, the dopamine dip detected at the level of the receptor could not propagate downstream. The high expression of G_{i/o}-specific RGS protein in striatal neurons could be a way for G_{i/o} to achieve this fast GTPase activity (Gold *et al.* 1997; Xie *et al.* 2012). GTPase activating proteins (GAP) like RGS could accelerate the intrinsic GTPase activity by several orders of magnitude (Kimple *et al.* 2011). However, stimulatory G proteins (G_{s/olf}) are not effectively acted on by the RGS proteins (Ross & Wilkie, 2000). Even though AC5 is known to act as a GAP protein for G_{s/olf}, it is not as efficient

as RGS on $G_{i/o}$ (Scholich *et al.* 1999). These differences in GAP for $G_{i/o}$ and $G_{s/olf}$ are consistent with D2 MSNs being more efficient in detecting dopamine dips than D1 MSNs. On the other hand, in order to detect a transient dopamine peak, D₁ and D₂ receptors and their associated G-protein activation kinetics should be fast: previously reported transient responses to dopamine suggest that the D1 and D2 signalling systems fulfil this requirement (Castro *et al.* 2013; Marcott *et al.* 2014; Yagishita *et al.* 2014).

Despite large advances in the understanding of the basal ganglia circuitry, a number of controversies persist. Whereas the classical model proposes an 'opposing' role for phasic and tonic dopamine, and direct and indirect pathways in the execution of motor programmes, other models describe a more complex integration through the network in which the temporal aspect is essential (Arbuthnott & Wickens, 2007; Nambu, 2008; Matsumoto & Hikosaka, 2009; Cui *et al.* 2013). Our data highlight an additional level of complexity which resides at the post-synaptic level, where a given neuromodulatory stimulus integrated through one signalling pathway allows for different integration schemes in the target neuron. Further complexity can arise from the differential splicing of D₂ receptor mRNA (Monsma *et al.* 1989). While our data pertain to the D₂ long variant that is the predominant form present at the postsynaptic level, differences in dopamine effect on cAMP–PKA signalling may be expected in pre-synaptic terminals, where the short variant is predominant (Khan *et al.* 1998; Usiello *et al.* 2000). D₃ receptors, which exhibit a high affinity for dopamine, may change the detection modes selectively in the ventral striatum, a feature that might be of therapeutic interest (Sokoloff *et al.* 1990; Sokoloff & Le Foll, 2017).

Other signalling pathways that are modulated in parallel with cAMP–PKA could also exhibit a selective responsiveness to a specific temporal pattern of dopamine stimulation. Indeed, dopamine receptors have been reported to couple to the G_q –phospholipase C pathway, the extracellular signal-regulated kinase (ERK), Src family kinases (SFKs), the arrestin–Akt–GSK3 β pathway, and hypothesized to facilitate cross-talk between various pathways (Hernandez-Lopez *et al.* 2000; Beaulieu *et al.* 2005, 2015; Del'Guidice *et al.* 2011; Pascoli *et al.* 2011, 2014; Gutierrez-Arenas *et al.* 2014). Whether these non-canonical signalling pathways can distinguish between tonic and phasic dopamine remains to be investigated. Local differences at the sub-cellular level may add another layer of complexity. While purely geometric factors play an important role, additional factors probably related to local differences in signalling proteins underlie different integrative properties that were reported between neighbouring sub-cellular compartments within a same neuron (Neves *et al.* 2008; Castro *et al.* 2010; Gervasi *et al.* 2010; Li *et al.* 2015; Maiellaro *et al.* 2016).

It is very likely that this whole system fluctuates *in vivo* under the influence of continuous changes in numerous neuromodulators. Adenosine levels change transiently within a wide temporal range (Cechova & Venton, 2008; Nguyen *et al.* 2014; Sims & Dale, 2014). Other neuromodulators such as acetylcholine (Threlfell *et al.* 2010, 2012; Nair *et al.* 2015), serotonin (Tanaka *et al.* 2007) or nitric oxide (Polito *et al.* 2013; Threlfell & West, 2013) are also likely to affect directly or indirectly cAMP signalling. Knowing the physiological conditions controlling these different neuromodulatory signals would allow a more comprehensive understanding of the physiology of D2 MSNs. Our modelling study depicts a system which lies at the border between different signal detection behaviours: relatively modest changes in these neuromodulators could lead to profound differences in MSN responsiveness to dopamine, switching the D2 MSNs between peak or tone sensing mode.

References

- Ahn JH, McAvoy T, Rakhilin SV, Nishi A, Greengard P & Nairn AC (2007a). Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 2979–2984.
- Ahn JH, Sung JY, McAvoy T, Nishi A, Janssens V, Goris J, Greengard P & Nairn AC (2007b). The B α /PR72 subunit mediates Ca²⁺-dependent dephosphorylation of DARPP-32 by protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 9876–9881.
- Albert PR, Neve KA, Bunzow JR & Civelli O (1990). Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J Biol Chem* **265**, 2098–2104.
- Allen MD & Zhang J (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 716–721.
- Arbuthnott GW & Wickens J (2007). Space, time and dopamine. *Trends Neurosci* **30**, 62–69.
- Atcherley CW, Wood KM, Parent KL, Hashemi P & Heien ML (2015). The coaction of tonic and phasic dopamine dynamics. *Chem Commun (Camb)* **51**, 2235–2238.
- Bateup HS, Svenningsson P, Kuroiwa M, Gong S, Nishi A, Heintz N & Greengard P (2008). Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci* **11**, 932–939.
- Bayer HM, Lau B & Glimcher PW (2007). Statistics of midbrain dopamine neuron spike trains in the awake primate. *J Neurophysiol* **98**, 1428–1439.
- Beaulieu JM, Espinoza S & Gainetdinov RR (2015). Dopamine receptors – IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* **172**, 1–23.
- Beaulieu JM & Gainetdinov RR (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* **63**, 182–217.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR & Caron MG (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* **122**, 261–273.

- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E & Girault JA (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* **28**, 5671–5685.
- Bertran-Gonzalez J, Hakansson K, Borgkvist A, Irinopoulou T, Bami-Cherrier K, Usiello A, Greengard P, Herve D, Girault JA, Valjent E & Fisone G (2009). Histone H3 phosphorylation is under the opposite tonic control of dopamine D2 and adenosine A2A receptors in striatopallidal neurons. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1710–1720.
- Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA & Valjent E (2010). What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections? *Front Neuroanat* **4**.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, Yan Z, Meijer L, Fienberg AA, Tsai LH, Kwon YT, Girault JA, Czernik AJ, Haganir RL, Hemmings HCJ, Nairn AC & Greengard P (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* **402**, 669–671.
- Biever A, Valjent E & Puighermanal E (2015). Ribosomal protein S6 phosphorylation in the nervous system: from regulation to function. *Front Mol Neurosci* **8**, 75.
- Bonaventura J, Navarro G, Casado-Anguera V, Azdad K, Rea W, Moreno E, Brugarolas M, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Cortes A, Volkow ND, Schiffmann SN, Ferré S & Casado V (2015). Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E3609–18.
- Bos JL (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 733–738.
- Bünemann M, Frank M & Lohse MJ (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 16077–16082.
- Castro LR, Brito M, Guiot E, Polito M, Korn CW, Herve D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol* **591**, 3197–3214.
- Castro LR, Gervasi N, Guiot E, Cavellini L, Nikolaev VO, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2010). Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci* **30**, 6143–6151.
- Cechova S & Venton BJ (2008). Transient adenosine efflux in the rat caudate-putamen. *J Neurochem* **105**, 1253–1263.
- Cerovic M, d'Isa R, Tonini R & Brambilla R (2013). Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. *Neurobiol Learn Mem* **105**, 63–80.
- Chelliah V, Juty N, Ajmera I, Ali R, Dumousseau M, Glont M, Hucka M, Jalowicki G, Keating S, Knight-Schrijver V, Lloret-Villas A, Natarajan KN, Pettit JB, Rodriguez N, Schubert M, Wimalaratne SM, Zhao Y, Hermjakob H, Le Novère N & Laibe C (2015). BioModels: ten-year anniversary. *Nucleic Acids Res* **43**, D542–8.
- Chen KC & Budygin EA (2007). Extracting the basal extracellular dopamine concentrations from the evoked responses: re-analysis of the dopamine kinetics. *J Neurosci Methods* **164**, 27–42.
- Chuhma N, Mingote S, Moore H & Rayport S (2014). Dopamine neurons control striatal cholinergic neurons via regionally heterogeneous dopamine and glutamate signaling. *Neuron* **81**, 901–912.
- Covey DP, Juliano SA & Garriss PA (2013). Amphetamine elicits opposing actions on readily releasable and reserve pools for dopamine. *PLoS One* **8**, e60763.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM & Costa RM (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* **494**, 238–242.
- Cumming P (2011). Absolute abundances and affinity states of dopamine receptors in mammalian brain: A review. *Synapse* **65**, 892–909.
- Day JJ, Roitman MF, Wightman RM & Carelli RM (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* **10**, 1020–1028.
- Del'Guidice T, Lemasson M & Beaulieu JM (2011). Role of beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the basal ganglia. *Front Neuroanat* **5**, 58.
- Di Chiara G & Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5274–5278.
- Dostmann WR & Taylor SS (1991). Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry* **30**, 8710–8716.
- Dreyer JK, Herrik KF, Berg RW & Hounsgaard JD (2010). Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci* **30**, 14273–14283.
- Ducros M, Moreaux L, Bradley J, Tiret P, Griesbeck O & Charpak S (2009). Spectral unmixing: analysis of performance in the olfactory bulb in vivo. *PLoS One* **4**, e4418.
- Dumartin B, Jaber M, Gonon F, Caron MG, Giros B & Bloch B (2000). Dopamine tone regulates D1 receptor trafficking and delivery in striatal neurons in dopamine transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1879–1884.
- Ehrengruber MU, Lundstrom K, Schweitzer C, Heuss C, Schlesinger S & Gähwiler BH (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7041–7046.
- Enjalbert A & Bockaert J (1983). Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol* **23**, 576–584.
- Ferré S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Azdad K & Schiffmann SN (2008). An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* **14**, 1468–1474.
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB & Fuxe K (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7238–7241.

- Gao ZG, Mamedova LK, Chen P & Jacobson KA (2004). 2-Substituted adenosine derivatives: affinity and efficacy at four subtypes of human adenosine receptors. *Biochem Pharmacol* **68**, 1985–1993.
- Gardner B, Liu ZF, Jiang D & Sibley DR (2001). The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation. *Mol Pharmacol* **59**, 310–321.
- Gerfen CR & Surmeier DJ (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* **34**, 441–466.
- Gervasi N, Hepp R, Tricoire L, Zhang J, Lambolez B, Paupardin-Tritsch D & Vincent P (2007). Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J Neurosci* **27**, 2744–2750.
- Gervasi N, Tchenio P & Preat T (2010). PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* **65**, 516–529.
- Gold SJ, Ni YG, Dohlmans HG & Nestler EJ (1997). Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* **17**, 8024–8037.
- Goon F (1997). Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum *in vivo*. *J Neurosci* **17**, 5972–5978.
- Grace AA (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci* **17**, 524–532.
- Grace AA & Bunney BS (1984a). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* **4**, 2877–2890.
- Grace AA & Bunney BS (1984b). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* **4**, 2866–2876.
- Gutierrez-Arenas O, Eriksson O & Kotaleski JH (2014). Segregation and crosstalk of D1 receptor-mediated activation of ERK in striatal medium spiny neurons upon acute administration of psychostimulants. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003445.
- Hart AS, Rutledge RB, Glimcher PW & Phillips PE (2014). Phasic dopamine release in the rat nucleus accumbens symmetrically encodes a reward prediction error term. *J Neurosci* **34**, 698–704.
- Heien ML, Khan AS, Ariansen JL, Cheer JF, Phillips PE, Wassum KM & Wightman RM (2005). Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 10023–10028.
- Hemmings HCJ, Greengard P, Tung HY & Cohen P (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* **310**, 503–505.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H & Surmeier DJ (2000). D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC β 1–IP₃–calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* **20**, 8987–8995.
- Higley MJ & Sabatini BL (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci* **13**, 958–966.
- Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P & Nairn AC (1999). Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* **274**, 7870–7878.
- Hulme EC & Trevethick MA (2010). Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* **161**, 1219–1237.
- Janssen MJ, Ade KK, Fu Z & Vicini S (2009). Dopamine modulation of GABA tonic conductance in striatal output neurons. *J Neurosci* **29**, 5116–5126.
- Kelly MP, Adamowicz W, Bove S, Hartman AJ, Mariga A, Pathak G, Reinhart V, Romegialli A & Kleiman RJ (2014). Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal* **26**, 383–397.
- Kenakin T (2013). New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR Review 2. *Br J Pharmacol* **168**, 554–575.
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A & Goldman-Rakic PS (1998). Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7731–7736.
- Kharkwal G, Radl D, Lewis R & Borrelli E (2016). Dopamine D2 receptors in striatal output neurons enable the psychomotor effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Kheirbek MA, Beeler JA, Ishikawa Y & Zhuang X (2008). A cAMP pathway underlying reward prediction in associative learning. *J Neurosci* **28**, 11401–11408.
- Kim OJ, Gardner BR, Williams DB, Marinac PS, Cabrera DM, Peters JD, Mak CC, Kim KM & Sibley DR (2004). The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization: evidence for a novel mechanism of arrestin association. *J Biol Chem* **279**, 7999–8010.
- Kimple AJ, Bosch DE, Giguère PM & Siderovski DP (2011). Regulators of G-protein signaling and their G α substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. *Pharmacol Rev* **63**, 728–749.
- Klotz KN, Camaioni E, Volpini R, Kachler S, Vittori S & Cristalli G (1999). 2-Substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A3 adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **360**, 103–108.
- Kozorovitskiy Y, Peixoto R, Wang W, Saunders A & Sabatini BL (2015). Neuromodulation of excitatory synaptogenesis in striatal development. *Elife* **4**.
- Kreitzer AC (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* **32**, 127–147.
- Kulagina NV, Zigmond MJ & Michael AC (2001). Glutamate regulates the spontaneous and evoked release of dopamine in the rat striatum. *Neuroscience* **102**, 121–128.
- Lee TH, Gee KR, Davidson C & Ellinwood EH (2002). Direct, real-time assessment of dopamine release autoinhibition in the rat caudate-putamen. *Neuroscience* **112**, 647–654.
- Li L, Gervasi N & Girault JA (2015). Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun* **6**, 6319.

- Lovinger DM (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* **58**, 951–961.
- Maiellaro I, Lohse MJ, Kittel RJ & Calebiro D (2016). cAMP signals in *Drosophila* motor neurons are confined to single synaptic boutons. *Cell Rep* **17**, 1238–1246.
- Marcott PF, Mamaligas AA & Ford CP (2014). Phasic dopamine release drives rapid activation of striatal D2-receptors. *Neuron* **84**, 164–176.
- Matsumoto M & Hikosaka O (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* **459**, 837–841.
- Mireniewicz J & Schultz W (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature* **379**, 449–451.
- Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC & Sibley DR (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* **342**, 926–929.
- Nair AG, Bhalla US & Hellgren Kotaleski J (2016). Role of DARPP-32 and ARPP-21 in the emergence of temporal constraints on striatal calcium and dopamine integration. *PLoS Comput Biol* **12**, e1005080.
- Nair AG, Gutierrez-Arenas O, Eriksson O, Vincent P & Hellgren-Kotaleski J (2015). Sensing positive versus negative reward signals through adenylyl cyclase-coupled GPCRs in direct and indirect pathway striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* **35**, 14017–14030.
- Nambu A (2008). Seven problems on the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 595–604.
- Nelson AB & Kreitzer AC (2014). Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci* **37**, 117–135.
- Neves SR, Tsokas P, Sarkar A, Grace EA, Rangamani P, Taubenfeld SM, Alberini CM, Schaff JC, Blitzer RD, Moraru II & Iyengar R (2008). Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell* **133**, 666–680.
- Nguyen MD, Lee ST, Ross AE, Ryals M, Choudhry VI & Venton BJ (2014). Characterization of spontaneous, transient adenosine release in the caudate-putamen and prefrontal cortex. *PLoS One* **9**, e87165.
- Nguyen QT, Tsai PS & Kleinfeld D (2006). MPSScope: a versatile software suite for multiphoton microscopy. *J Neurosci Methods* **156**, 351–359.
- Nicholson C (2005). Factors governing diffusing molecular signals in brain extracellular space. *J Neural Transm (Vienna)* **112**, 29–44.
- Nishi A, Bibb JA, Matsuyama S, Hamada M, Higashi H, Nairn AC & Greengard P (2002). Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A. *J Neurochem* **81**, 832–841.
- Nishi A, Bibb JA, Snyder GL, Higashi H, Nairn AC & Greengard P (2000). Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12840–12845.
- Nishi A, Kuroiwa M, Miller DB, O'Callaghan JP, Bateup HS, Shuto T, Sotogaku N, Fukuda T, Heintz N, Greengard P & Snyder GL (2008). Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci* **28**, 10460–10471.
- Nishi A, Snyder GL & Greengard P (1997). Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* **17**, 8147–8155.
- Nishi A, Watanabe Y, Higashi H, Tanaka M, Nairn AC & Greengard P (2005). Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 1199–1204.
- Paladini CA & Roeper J (2014). Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience* **282**, 109–121.
- Pascoli V, Besnard A, Hervé D, Pagès C, Heck N, Girault JA, Caboche J & Vanhoutte P (2011). Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* **69**, 218–227.
- Pascoli V, Cahill E, Bellivier F, Caboche J & Vanhoutte P (2014). Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biol Psychiatry* **76**, 917–926.
- Polito M, Guiot E, Gangarossa G, Longueville S, Doulazmi M, Valjent E, Hervé D, Girault JA, Paupardin-Tritsch D, Castro LR & Vincent P (2015). Selective effects of PDE10A inhibitors on striatopallidal neurons require phosphatase inhibition by DARPP-32. *eNeuro* **2**, 1–15.
- Polito M, Klarenbeek J, Jalink K, Paupardin-Tritsch D, Vincent P & Castro LR (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci* **7**, 211.
- Polito M, Vincent P & Guiot E (2014). Biosensor imaging in brain slice preparations. In *1071*, ed. Zhang J, pp. 175–194. Humana Press, New York.
- Reynolds JN, Hyland BI & Wickens JR (2001). A cellular mechanism of reward-related learning. *Nature* **413**, 67–70.
- Richfield EK, Penney JB & Young AB (1989). Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **30**, 767–777.
- Ross EM & Wilkie TM (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu Rev Biochem* **69**, 795–827.
- Schoffelmier AN, Hogenboom F, Mulder AH, Ronken E, Stoof JC & Drukarch B (1994). Dopamine displays an identical apparent affinity towards functional dopamine D1 and D2 receptors in rat striatal slices: possible implications for the regulatory role of D2 receptors. *Synapse* **17**, 190–195.
- Scholic K, Mullenix JB, Wittpoth C, Poppleton HM, Pierre SC, Lindorfer MA, Garrison JC & Patel TB (1999). Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* **283**, 1328–1331.
- Schultz W (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* **36**, 241–263.
- Schultz W (2010). Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct* **6**, 24.
- Schultz W & Romo R (1987). Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *J Neurophysiol* **57**, 201–217.

- Shen W, Flajolet M, Greengard P & Surmeier DJ (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* **321**, 848–851.
- Sims RE & Dale N (2014). Activity-dependent adenosine release may be linked to activation of Na⁺-K⁺ ATPase: an *in vitro* rat study. *PLoS One* **9**, e87481.
- Skinbjerg M, Sibley DR, Javitch JA & Abi-Dargham A (2012). Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor *in vivo*: fact or fiction? *Biochem Pharmacol* **83**, 193–198.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML & Schwartz JC (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* **347**, 146–151.
- Sokoloff P & Le Foll B (2017). The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *Eur J Neurosci* **45**, 2–19.
- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L & Vargas J (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience* **198**, 3–18.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z & Shen W (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* **30**, 228–235.
- Swapna I, Bondy B & Morikawa H (2016). Differential dopamine regulation of Ca²⁺ signaling and its timing dependence in the nucleus accumbens. *Cell Rep* **15**, 563–573.
- Tanaka SC, Schweighofer N, Asahi S, Shishida K, Okamoto Y, Yamawaki S & Doya K (2007). Serotonin differentially regulates short- and long-term prediction of rewards in the ventral and dorsal striatum. *PLoS One* **2**, e1333.
- Threlfell S, Clements MA, Khodai T, Pinaar IS, Exley R, Wess J & Cragg SJ (2010). Striatal muscarinic receptors promote activity dependence of dopamine transmission via distinct receptor subtypes on cholinergic interneurons in ventral versus dorsal striatum. *J Neurosci* **30**, 3398–3408.
- Threlfell S, Lalic T, Platt NJ, Jennings KA, Deisseroth K & Cragg SJ (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* **75**, 58–64.
- Threlfell S & West AR (2013). Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia* **3**, 137–146.
- Usiello A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV & Borrelli E (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* **408**, 199–203.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Fisone G & Girault JA (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci* **32**, 538–547.
- Vidi PA, Chemel BR, Hu CD & Watts VJ (2008). Ligand-dependent oligomerization of dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors in living neuronal cells. *Mol Pharmacol* **74**, 544–551.
- Waelbroeck I (1999). Kinetics versus equilibrium: the importance of GTP in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 477–481.
- Watts VJ & Neve KA (1996). Sensitization of endogenous and recombinant adenylyl cyclase by activation of D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol* **50**, 966–976.
- Watts VJ, Wiens BL, Cumbay MG, Vu MN, Neve RL & Neve KA (1998). Selective activation of Galphao by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *J Neurosci* **18**, 8692–8699.
- Weiss S, Sebben M, Garcia-Sainz JA & Bockaert J (1985). D2-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Mol Pharmacol* **27**, 595–599.
- West AR & Grace AA (2002). Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining *in vivo* intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci* **22**, 294–304.
- Xie K, Masuho I, Brand C, Dessauer CW & Martemyanov KA (2012). The complex of G protein regulator RGS9-2 and Gβ(5) controls sensitization and signaling kinetics of type 5 adenylyl cyclase in the striatum. *Sci Signal* **5**, ra63.
- Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GC, Urakubo H, Ishii S & Kasai H (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* **345**, 1616–1620.

Additional information

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

C.Y., A.G.N., L.C. and L.R.C. performed experiments. C.Y., A.G.N., L.R.C., J.H.K. and P.V. analysed data and drafted the work. All authors have approved the final version of the manuscript, agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

Labex Biopsy; Ecole des Neurosciences de Paris; DIM Cerveau Pensée Région Ile-de-France; The European Horizon2020 Framework Programme under grant agreement no. 720270 (Human Brain Project SGA1); The Swedish Research Council; National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Grant 2R01AA016022; Swedish e-Science Research Center; EuroSPIN – an Erasmus Mundus Joint Doctoral programme.

Acknowledgements

We thank Aurélie Ky, Jérôme Tange and Bryon Da Silva for helpful contributions to the experimental work. We thank Professor Juan Llopis for helpful discussions and comments on the manuscript, and Professor Kazuya Kikuchi for his insight in chemistry.

Translational perspective

A number of clinically used drugs, and in particular most (if not all) antipsychotics, are antagonists of dopamine receptors. Although these drugs clearly improve the patient's condition, they do not alleviate all the symptoms of the disease and inflict some undesirable side-effects. Biosensor imaging on live brain slices allows for a dynamic measurement of the cellular response to a transient neuro-modulatory stimulus. This approach revealed that, surprisingly, dopamine has a similar efficacy on D₁ and D₂ receptors, in contradiction to many biochemical measurements. The added value of this approach lies in: (1) the dynamic aspect of the measurement, which circumvents slow adaptations and desensitization processes; (2) the fact that the measurement is performed on endogenous receptors in living neurons; (3) the possibility to probe individual neurons in a defined brain region. The benefits of this approach in the development of novel drugs acting on dopamine receptors could be twofold. First, it can provide a measurement of drug efficacy and potency on the functional response to dopamine, in particular a quantitative comparison of drug efficacies on neurons expressing different subtypes of dopamine receptors, thus helping define a therapeutic window. Secondly, by adding a temporal dimension to analysis of receptor action on intracellular signalling, it may change our conception of the pathophysiological role played by the therapeutic target.

Supporting information

The following supporting information is available in the online version of this article.

Video S1. Time-course of changes in cAMP in D1 and D2 MSNs.

Video S2. Time-course of changes in PKA-dependent phosphorylation level in D1 and D2 MSNs.

Article 2 : Des réponses PKA de type “tout ou rien” dans le noyau des neurones épineux striataux

Les implications de la PKA dans la régulation de l'expression génique sont connues depuis longue date, et, selon des observations effectuées principalement sur des cellules non-neuronales, la transduction des signaux PKA du cytosol vers le noyau est limitée par la diffusion lente et passive des sous-unités catalytiques de la PKA dans le compartiment nucléaire. Cependant la dynamique et les spécificités de la signalisation PKA nucléaire dans les neurones restent peu étudiées à ce jour. Dans cette étude, en combinant deux approches, celle de l'imagerie de biosenseurs de l'activité PKA, exprimés dans des tranches de cerveau de souris, et une approche de modélisation informatique, nous avons sondé les effets de divers stimuli pharmacologiques notamment des stimuli dopaminergiques transitoires sur la dynamique des signaux PKA nucléaires dans les neurones épineux moyens D1 striataux et dans les neurones pyramidaux D₁R⁺ du cortex préfrontal. Nous avons d'une part observé que le signal PKA nucléaire induit par les stimuli dopaminergiques transitoires dans les neurones épineux D1 est ultrasensible, induisant efficacement l'expression du gène précoce c-fos, et qu'il est doté d'une cinétique particulièrement rapide, en comparaison avec le signal PKA nucléaire dans les neurones du cortex, dont la cinétique est comparable à ce qui a été déjà décrit dans d'autres types cellulaires non-neuronaux. Cette particularité du signal PKA nucléaire demeure en faisant varier la nature du stimulus (stimulation des récepteurs D₁ à la membrane, stimulation des adénylyl cyclases, stimulation directe de la PKA cytosolique par photolibération d'AMPc), et est également retrouvée dans les neurones épineux D2. D'autre part nous avons aussi observé que les neurones épineux D1 génèrent des réponses PKA nucléaires au profil “tout-ou-rien” suite à l'activation des récepteurs D₁. Notre modèle numérique suggère que ce motif non linéaire de la réponse PKA nucléaire repose sur l'existence d'un mécanisme de “feedforward” positif, inhibant l'activité phosphatase nucléaire - peut-être médié par la protéine DARPP-32 - et qui permettrait aux neurones épineux striataux de détecter avec plus de sensibilité les signaux dopaminergiques transitoires souvent associés à l'apprentissage motivé par les récompenses.

RESEARCH ARTICLE

Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons

Cédric Yapo¹, Anu G. Nair^{2,3,4,‡}, Jeanette Hellgren Kotaleski^{2,5}, Pierre Vincent^{1,*,§} and Liliana R. V. Castro^{1,*}

ABSTRACT

Although it is known that protein kinase A (PKA) in the nucleus regulates gene expression, the specificities of nuclear PKA signaling remain poorly understood. Here, we combined computational modeling and live-cell imaging of PKA-dependent phosphorylation in mouse brain slices to investigate how transient dopamine signals are translated into nuclear PKA activity in cortical pyramidal neurons and striatal medium spiny neurons. We observed that the nuclear PKA signal in striatal neurons featured an ultrasensitive responsiveness, associated with fast all-or-none responses, which is not consistent with the commonly accepted theory of a slow and passive diffusion of catalytic PKA in the nucleus. Our numerical model suggests that a positive feed-forward mechanism inhibiting nuclear phosphatase activity – possibly mediated by DARPP-32 (also known as PPP1R1B) – could be responsible for this non-linear pattern of nuclear PKA response, allowing for a better detection of the transient dopamine signals that are often associated with reward-mediated learning.

KEY WORDS: Protein kinase A, Biosensor imaging, Modeling, Nucleus, Signal integration

INTRODUCTION

The cAMP–PKA signaling pathway plays a key role in virtually all cell types by acutely regulating various cell functions, such as metabolism, motility and excitability. This signaling cascade additionally exerts long-term effects by regulating the expression of genes in the nucleus. Despite considerable knowledge obtained through decades of studies on PKA signaling, its dynamics in the nucleus remains poorly characterized. The PKA holoenzyme is a tetramer comprising two catalytic (C) and two regulatory (R) subunits, for which several isoforms have been described: three catalytic isoforms ($C\alpha$, $C\beta$ and $C\gamma$, encoded by *PRKACA*, *PRKACB* and *PRKACG*, respectively) can bind to four different R isoforms ($R1\alpha$, $R1\beta$, $R2\alpha$ and $R2\beta$, encoded by *PRKAR1A*, *PRKAR1B*, *PRKAR2A* and *PRKAR2B*, respectively). $R2\beta$ is the most abundant regulatory subunit in many types of neurons (Cadd and McKnight, 1989), and is required for the nuclear integration of PKA signals (Brandon et al., 1998). In the case of the type II PKA holoenzyme,

an increase in cAMP concentration releases the catalytic subunits, which can then diffuse throughout the cell (Kim et al., 2011; Martin et al., 2007; Tillo et al., 2017), and the passive diffusion of the catalytic subunit through the nuclear pore is thought to be the main mechanism whereby the cAMP–PKA signal is transduced into the nucleus. Experiments performed with chemically labeled PKA subunits have shown that this diffusion process occurred on a time scale of tens of minutes, and is associated with CREB phosphorylation and the induction of gene expression (Hagiwara et al., 1993; Harootunian et al., 1993; Meinkoth et al., 1990). Although neurons in several brain regions seem to follow this signaling scheme (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011), it remains puzzling that a specific brain region, the striatum, responds with superior sensitivity to dopamine signals: addictive drugs for instance, which trigger a large release of dopamine in the cortex and the striatum, increase the expression of c-Fos primarily in the striatum through the activation of D_1 receptors (Graybiel et al., 1990; Harlan and Garcia, 1998).

Dopamine is released in the striatum and prefrontal cortex by the midbrain dopaminergic neurons. The effects of dopamine are mediated by the D_1 -like ($DRD1$, $DRD5$) and D_2 -like ($DRD2$, $DRD3$, $DRD4$) receptors, which oppositely modulate the cAMP–PKA signaling pathway, thereby regulating a number of neuronal properties (Beaulieu et al., 2015; Girault, 2012; Threlfell and West, 2013; Tritsch and Sabatini, 2012). In the dorsal striatum, these receptors are expressed on two different types of medium-sized spiny neurons (MSNs), hereafter called $D1$ and $D2$ MSNs (Le Moine and Bloch, 1995; Valjent et al., 2009). Transient dopamine stimulations trigger opposite changes in cAMP–PKA signaling in these neurons, over a time-scale of a few minutes, which can be recorded through biosensor imaging (Yapo et al., 2017). The burst firing of dopaminergic neurons leads to the phasic release of dopamine, and supports a wide range of functions associated with salience and reward processing (Arbuthnott and Wickens, 2007; Bromberg-Martin et al., 2010; Schultz, 2007). Despite the brevity of phasic dopamine release, burst firing of the dopamine neurons triggers the induction of immediate early genes (IEGs) in $D1$ MSNs, leading to long-term changes in gene expression and plasticity in the striatal neurons (Chergui et al., 1996; Howard et al., 2013). Striatal neurons differ from cortical neurons notably because they have a higher expression level of dopamine receptors or DARPP-32 (also known as PPP1R1B), and express specific signaling proteins such as $G_{\alpha_{olf}}$, type V adenylyl cyclase and type 10 phosphodiesterase. These unusual signaling enzymes are associated with faster and larger cAMP–PKA responses to dopamine in the cytosol (Castro et al., 2013), and we wanted to explore whether signal transduction in the nucleus of striatal neurons also possessed specific mechanisms to enhance its sensitivity. To answer this question, we combined live-cell imaging of PKA activity in the cytosol and nucleus, with computational modeling based on our previously published model (Yapo et al., 2017). We found that transient dopamine stimuli trigger ultrasensitive and switch-like nuclear PKA responses in the striatum, and our computer model suggests that this feature depends on a

¹Sorbonne Université, CNRS, Biological Adaptation and Ageing, F-75005 Paris, France. ²Science for Life Laboratory, School of Computer Science and Communication, KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, 10044, Sweden. ³National Centre for Biological Sciences, Tata Institute of Fundamental Research, Bangalore 560065, India. ⁴Manipal University, Manipal 576104, India. ⁵Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Solna, 17177, Sweden. [‡]Present address: Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zurich, Switzerland. ^{*}These authors contributed equally to this work

[§]Author for correspondence (pierre.vincent@upmc.fr)

 A.G.N., 0000-0002-1952-9583; J.H.K., 0000-0002-0550-0739; P.V., 0000-0002-8479-1908; L.R.V.C., 0000-0001-8902-089X

positive feed-forward mechanism in the nucleus, which results in a high PKA to protein phosphatase activity ratio.

RESULTS

Transient dopamine stimulations lead to robust and fast PKA signaling in the nucleus of D1 MSNs

We first tested whether a transient dopamine stimulus was sufficient to trigger a PKA-dependent response in the nucleus. Dopamine D₁ receptors in striatal and cortical neurons (layer V) were briefly stimulated by dopamine released from NPEC-DA (5 μ M) by means of a flash of UV light (0.1 or 1 s duration). We monitored the induction of c-Fos, an IEG induced by dopamine (Chergui et al., 1996). Nuclei positive for c-Fos expression were counted, and a robust increase in c-Fos expression was observed in the striatum 1.5 h following dopamine uncaging (Fig. 1A). The same protocol applied to the prefrontal cortex elicited no response (Fig. 1B). As a positive control, brain slices treated for 5 min with the adenylate cyclase activator forskolin (fsk, 13 μ M) showed increased c-Fos immunoreactivity in both striatum and cortex. This suggests that, unlike cortical neurons, striatal MSNs efficiently transduce a transient neuromodulatory signal in the nuclear compartment.

We then monitored the dynamics of PKA signaling in the cytosolic and nuclear compartments using the AKAR3 and AKAR2-NLS biosensors, respectively (Allen and Zhang, 2006; Zhang et al., 2005). Both biosensors report changes in the PKA-to-phosphatase equilibrium through a change in FRET efficacy, which was quantified with wide-field ratiometric imaging. Dopamine uncaging in the striatum (UV 0.1 s) rapidly increased the AKAR2-NLS signal ratio in D1 MSNs (Fig. 1C). After recovery of the ratio, application of a saturating dose of the D₁-like receptors agonist SKF-38393 (SKF, 1 μ M) triggered a steep elevation of the biosensor response, which was not further increased by the application of adenylyl cyclase activator forskolin (fsk, 13 μ M). This same protocol of 0.1 s uncaging produced no response in the nucleus of cortical neurons, and we increased the UV duration (1 s instead of 0.1 s) to release more dopamine: yet, cortical neurons remained unresponsive (Fig. 1D). Subsequent stimulation of the D₁ receptors with SKF eventually induced a large, but submaximal, increase in the AKAR2-NLS ratio, a response which appeared to have slower kinetics compared to the SKF response in D1 MSNs. Overall, $77 \pm 13\%$ (results in main text are mean $\pm$ s.e.m.) of the neurons in layer V of the prefrontal cortex responded positively to D₁ receptor stimulation with 1 μ M SKF at the cytosolic level [$n=172$; $N=11$; where ' N ' indicates the number of independent experiments (i.e. brain slices), and ' n ' indicates the number of cells]. Similar experiments were repeated and averaged using either the AKAR3 or AKAR2-NLS biosensors; although the cytosolic signals were of similar amplitude in striatal and cortical neurons, only striatal neurons displayed a nuclear response (Fig. 1E,F).

To ensure that the measurements were comparable between the two brain regions, we tested whether the dynamic range of the AKAR2-NLS biosensor was the same in the striatum and in the cortex. The maximal ratio change was taken as the $\Delta R/R$ value between the basal ratio and the highest ratio response obtained in the experiment (1 μ M SKF or 13 μ M fsk). This value showed no difference (11.18 ± 0.12 , $n=271$, $N=19$ in the cortex versus 11.20 ± 0.23 , $n=217$, $N=26$ in the striatum; $P=0.9$, unpaired t -test), indicating that the biosensor reports changes in PKA-to-phosphatase equilibrium in a same dynamic range in both brain regions.

Cortical neurons express D₁- as well as D₂-like receptors, which exert antagonistic effects on PKA signaling (Beaulieu et al., 2015; Vincent et al., 1993). To rule out interactions with D₂ receptors, we

replaced dopamine uncaging with applications of the D₁-like agonist SKF-38393 (SKF, 1 μ M). SKF was applied briefly (10 s) with a fast microperfusion system, then the drug was washed-out in the bath perfusion. The cytosolic or nuclear PKA signals were monitored with the biosensors AKAR3 and AKAR2-NLS, respectively. Similar to what was observed with dopamine uncaging, the 10 s SKF stimulation failed to induce any AKAR2-NLS response in the cortex, whereas D1 MSNs in the striatum still displayed a robust response (Fig. 2A,B). We then tested the effect of sustained D₁ receptor stimulation on both cortical and striatal neurons. SKF (1 μ M) was applied using the fast microperfusion system, and its application on the slice was maintained until a steady-state response was reached (Fig. 2C,D). The maximal response in cytosolic PKA signal was reached in less than 1 min in both striatum and cortex, with the striatum response being faster than that from the cortex, as expected from our previous work (Castro et al., 2013). In contrast to the rapid PKA activation seen in the cytosol, the nuclear PKA signal proceeded at a slower pace in both cell types [time to the half-maximum response ($t_{1/2on}$) 482 ± 22 s, $N=5$ in the cortex versus 211 ± 6 s, $N=6$ in the striatum], with the nuclear response in the striatum remaining faster and of larger amplitude than in the cortex (Fig. 2C,D). Similarly fast nuclear kinetics were also observed in D2 MSNs following stimulation of the adenosine A_{2A} receptors with CGS21680 (Fig. 2E), showing that the fast responsiveness is a shared feature of both subtypes of striatal MSNs.

Striatal neurons express high densities of dopamine receptors and G proteins. Therefore, we wondered whether the fast responsiveness resulted from this or from other downstream mechanisms. In order to bypass the first level of signal integration, we directly stimulated adenylyl cyclases with forskolin, and to take out of the equation the degradation pathway, phosphodiesterases were blocked with IBMX. Rapid application of fsk+IBMX produced nuclear responses that were faster in the striatum than in the cortex ($t_{1/2on}=399 \pm 13$ s, $N=7$ in the cortex versus 249 ± 9 s, $N=6$ in the striatum, unpaired two-tailed Student's t -test, $P<0.05$; Fig. 2F) showing that, indeed, striatal neurons possess specific mechanisms downstream of the receptor that speed-up nuclear integration of PKA signals.

Switch-like nuclear PKA responses in the striatum

The efficiency of transient dopamine signals in inducing a nuclear response, as well as its speed depicted above, suggested some non-linear effect in signal integration in MSNs, which could affect the responsiveness to low doses of SKF. We used the fast perfusion system to perform sustained SKF stimulations at low doses, ranging from 0.1 to 10 nM, and we measured the amplitude of the SKF-induced nuclear response using AKAR2-NLS, again comparing striatum and cortex. A single low dose of SKF was tested in each experiment. At the end of the recording, 1 μ M SKF was applied to reveal D1 MSNs. This level was used as maximum for normalization, as the application of fsk at the end of the recording produced no further increase. At a concentration of 2 nM SKF for instance (Fig. 3A, left), D1 MSNs showed either no or very small responses, or an almost maximal response. In contrast, cortical neurons stimulated with 10 nM SKF responded with a continuum of amplitudes (Fig. 3A, right). At the end of the recording, 1 μ M SKF was applied to reveal the cortical neurons which express D₁ receptors (estimated to be 77%, see above). Further application of fsk at the end of the recording increased the ratio to the value considered as maximal, and was used for normalization.

The same type of experiment was repeated using different concentrations of SKF for the first stimulation, and the amplitude of

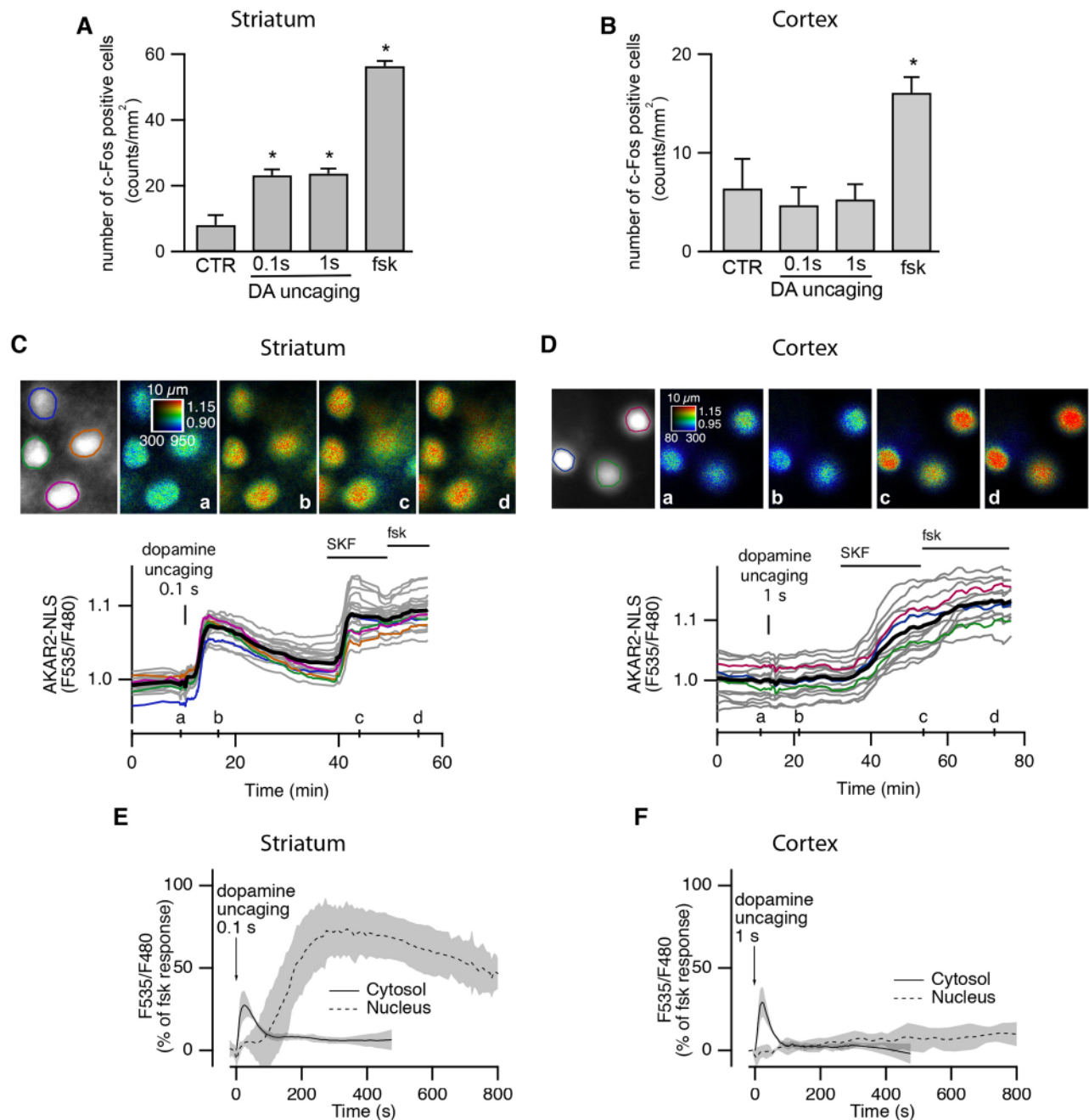


Fig. 1. A brief dopamine stimulation triggers a nuclear PKA signal in the striatum but not in the prefrontal cortex. (A,B) c-Fos-positive nuclei in the dorsal striatum (A) and prefrontal cortex (B) following dopamine uncaging (5 μ M NPEC-DA, uncaging for 0.1 s and 1 s) or application of the adenylyl cyclase activator forskolin (fsk, 13 μ M, applied for 5 min). (C,D) Wide-field imaging of the AKAR2-NLS sensor in the dorsal striatum (C) and prefrontal cortex (D). Raw fluorescence of the donor is displayed in gray and the donor:acceptor fluorescence ratio is displayed in pseudo-color. Each trace on the graph indicates the F535/F480 emission ratio measurement on regions indicated by the color contour drawn on the gray image. Traces in gray correspond to nuclei outside this region of the image. The thick black traces represent averages. Ratio images (a–d) correspond to the time points indicated in the bottom graph. Dopamine released from NPEC-DA (5 μ M, 0.1 s or 1 s) by UV uncaging generates a transient positive response in medium-sized spiny neurons of the striatum (C) but not in the cortex (D). The D₁ receptor agonist SKF-38393 (SKF, 1 μ M) and forskolin (fsk, 13 μ M) are applied at the end of the experiment as positive controls. (E,F) The traces of individual cells and their average ratio responses are normalized with respect to the maximal fsk response. PKA signals in the cytosol and nucleus are measured with AKAR3 and AKAR2-NLS biosensors, respectively. The line represents the mean, the gray shade represents s.e.m.

this SKF response was plotted for each individual neuron against SKF concentration (Fig. 3B). In the striatum, as SKF concentration increases, more cells exhibit a ratio change close to the maximum, while very few show an intermediate signal (Fig. 3B, left). In contrast, cortical neurons showed responses covering the whole range of amplitude level (Fig. 3B, right). For the highest dose (1 μ M SKF), the response was smaller on average than for 100 nM,

possibly because of desensitization of the D₁ receptor over long applications of high doses. Data were plotted as cumulative probabilities for each concentration, and showed a non-linear profile for the striatum (particularly visible for 1 nM SKF concentration), indicative of a bimodal distribution (Fig. 3C, left). Cumulative probabilities calculated for cortical neurons showed linear profiles for all concentrations (Fig. 3C, right). The pooled

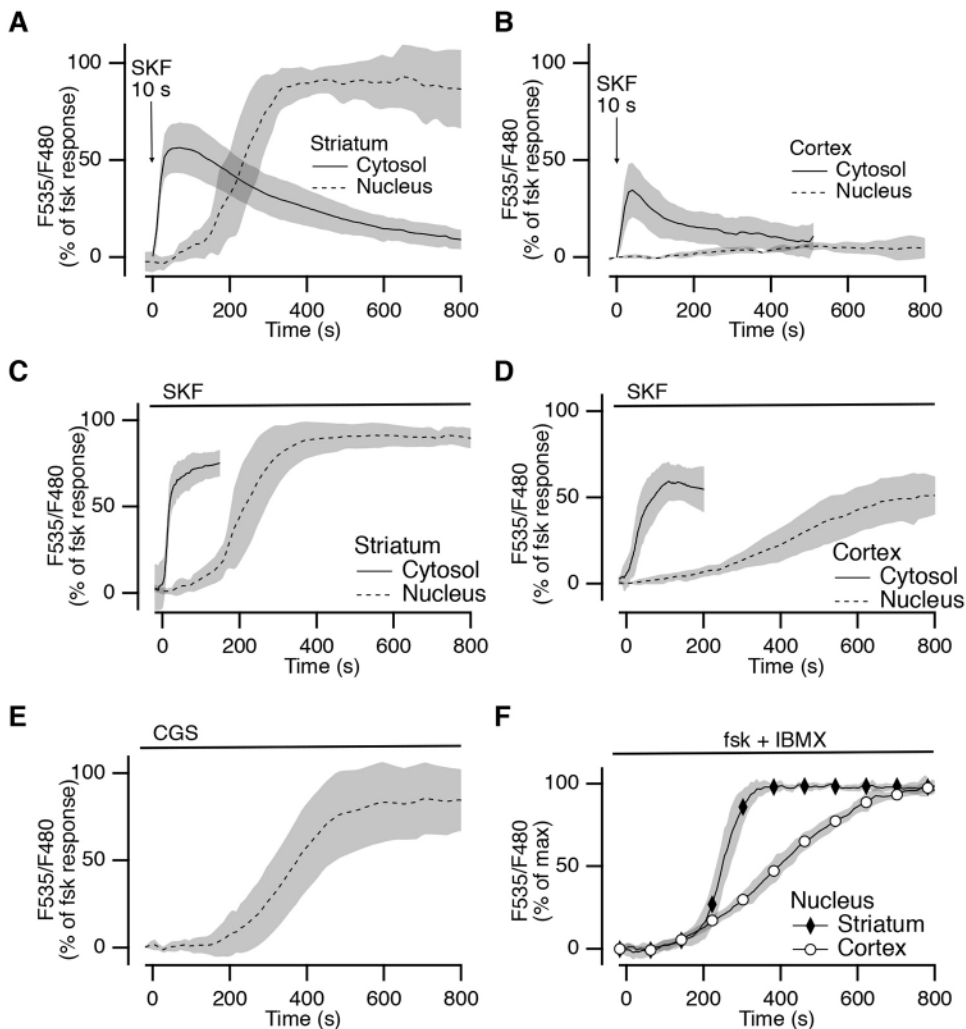


Fig. 2. Robust and fast PKA signal in the nucleus of striatal neurons. (A,B) Cytosolic (solid lines, measured with AKAR3) and nuclear (dotted lines, measured with AKAR2-NLS) PKA responses elicited by a 10 s application of the D₁-like agonist SKF-38393 (SKF, 10 s, 1 μM) in the striatum (A) and prefrontal cortex (B). (C,D) Onset of the cytosolic (solid lines) and nuclear (dotted lines) PKA responses in D1 MSNs (C) and cortical neurons (D) following sustained application of SKF. (E) Onset of the nuclear PKA response in D2 MSNs of the striatum following application of the A_{2A} agonist CGS 21680 (1 μM). (F) Onset of the nuclear PKA responses in D1 MSNs of the striatum and cortical neurons following sustained application of adenylyl cyclase activator forskolin (fsk, 13 μM) and the phosphodiesterase inhibitor IBMX (200 μM). Mean responses from four to six independent experiments/condition are represented and expressed as a percentage of the response to fsk or fsk+IBMX, as indicated. The shaded area represents the s.e.m.

responses of all individual striatal neurons ($N=34$, $n=286$) displayed as probability density graph showed a large peak at the maximal level that was separated from the baseline peak by a wide gap, a signature of an ‘all-or-none’ signal integration (Fig. 3D). This bimodal distribution contrasted with the graded responses measured in the prefrontal cortex ($N=22$, $n=315$), which showed a wide central peak that was not well separated from the baseline peak (Fig. 3D).

Overall, these results depict the nuclear compartment of MSNs as particularly responsive to transient stimulation of the D₁ receptors, producing robust PKA-dependent phosphorylations in both cytosolic and nuclear compartments, with a switch-like mechanisms that controls the transfer of the signal from the cytosol into the nucleus.

The nuclear responsiveness in D1 MSNs does not result from the existence of a nuclear pool of PKA

cAMP can diffuse freely throughout the cell and in the nucleus (DiPilato et al., 2004; Haj Slimane et al., 2014; Yang et al., 2014) and other studies have reported the presence of PKA holoenzyme in the nuclear compartment, which might support the fast kinetics of the nuclear PKA responses (Ilouz et al., 2017; Sample et al., 2012; Zippin et al., 2004). We tested this hypothesis in our preparations by photo-releasing cAMP inside the neurons using a cell-permeant caged cAMP (4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine 3,5-cyclic monophosphate, DMNB-cAMP). Striatal and cortical brain slices were incubated with DMNB-cAMP (10 μM) for 10 min,

and wide-field uncaging with a 1 s UV flash was performed to increase cAMP levels evenly in all cellular compartments, including the nucleus. This type of stimulation induced a very fast and transient activation of PKA in the cytosol of both striatal and cortical neurons (Fig. 4). The amplitude of the transient cytosolic PKA responses reached ~80% of maximal fsk-induced response in both cell types. However, in the nucleus, the PKA responses differed markedly: no response was observed in the cortex, whereas in the striatum, cAMP uncaging induced a robust increase in AKAR2-NLS ratio, with onset kinetics similar to that obtained with dopamine uncaging or upon a 10 s SKF stimulation. This further confirms that a same cAMP signal is integrated much more efficiently in striatal than in cortical neurons. More importantly, while AKAR3 instantly responded in the cytosol, a delay of ~100 s was observed for the AKAR2-NLS response in striatal cells, which contradicts the hypothesis of PKA residing in the nucleus and being activated there, as the nuclear response would be expected to have the same kinetics as the cytosolic response if that were the case. Based on these results, we conclude that the AKAR2-NLS responses triggered by receptor stimulation or cAMP photorelease requires diffusion of PKA catalytic subunits into the nucleus.

PP1 activity reverts nuclear PKA signaling in the cortex

We then investigated the cellular mechanisms that dampen the cAMP–PKA signaling pathway in cortical neurons and may thus prevent the nuclear transduction of dopamine signals. Among these,

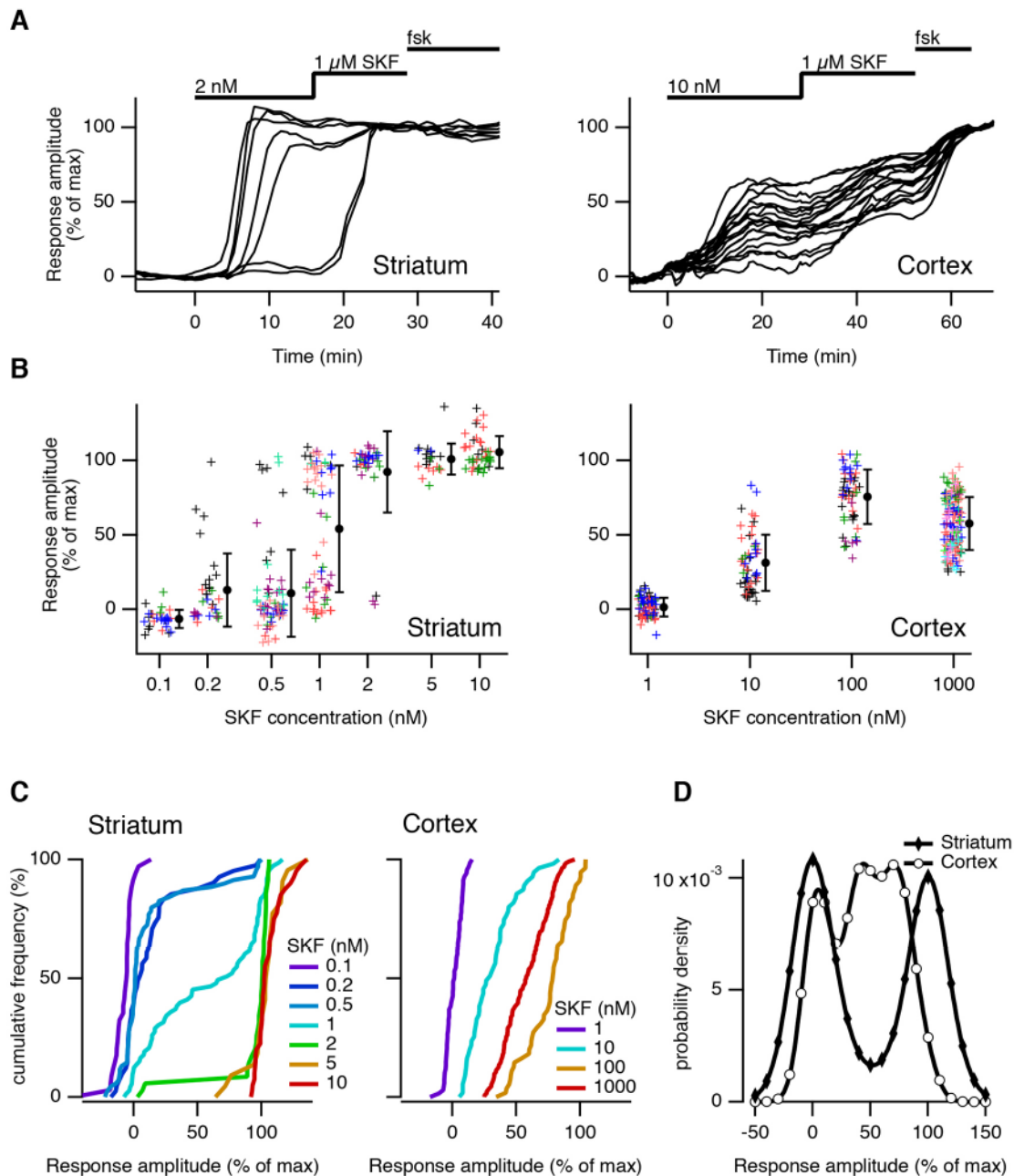


Fig. 3. Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. (A) AKAR2-NLS normalized ratio during sustained application of the D₁-like agonist SKF-38393 (SKF). Two representative experiments in striatal (left) and cortical (right) brain slices are shown: each trace indicates the ratio measured on the nucleus of individual neurons, normalized between the basal and maximal ratio. The bars on top of the graph indicate the application of drugs. (B) Similar experiments were repeated with different doses of SKF for the first SKF application in the striatum (left) and in the cortex (right). Each neuron is represented by a marker on the graph. Neurons from the same experiment are displayed in the same color. The mean ± s.e.m. is indicated for each dose. (C) Same data as in B represented as cumulative frequencies for the striatum (left) and the cortex (right). Note the kink on the profile corresponding to 1 nM SKF in the striatum. (D) Probability density estimate of all pooled responses in the striatum and in the cortex.

it is known that the phosphodiesterase PDE4 powerfully controls cAMP levels in cortical neurons (Zhang et al., 2002) and we tested whether inhibiting PDE4 might reveal a nuclear response. As expected from our previous work (Castro et al., 2010, 2013), application of the PDE4 inhibitor rolipram (100 nM) increased the amplitude of the cytosolic AKAR3 response to a brief (10 s) SKF stimulation (Fig. 5A,B). However, even under PDE4 inhibition, the nucleus of cortical neurons barely responded to 10 s SKF stimulations (amplitude of the response at 800 s = $4.4 \pm 2.2\%$, $N=4$ in control versus $19.6 \pm 5.5\%$, $N=5$ under rolipram, unpaired

two-tailed *t*-test, $P < 0.05$; Fig. 5C,D). These results indicate that in cortical neurons, although PDE4 activity affects the amplitude of the cytosolic PKA response, its effect in the nucleus is minimal, indicating that another mechanism is counteracting the nuclear PKA signal.

The phosphorylation level of PKA targets (including AKAR biosensors) proceeds from a balance between PKA and protein phosphatase activities; therefore, we hypothesized that higher protein phosphatase activities in cortical neurons might explain the lack of nuclear response. In the brain, PP1, PP2A and PP2B are

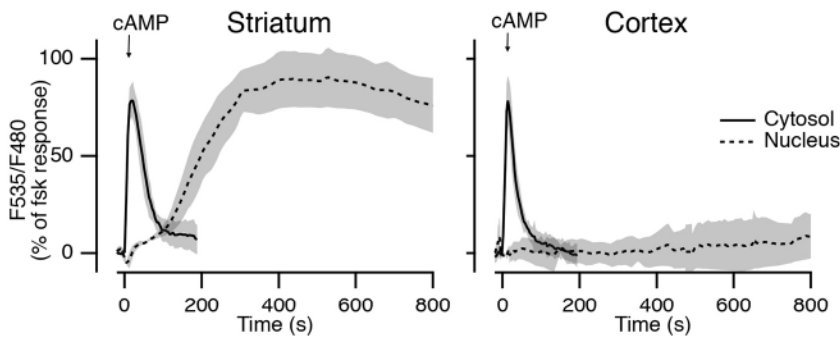


Fig. 4. Global cAMP uncaging produces a delayed PKA response in the nucleus of striatal neurons. Mean cytosolic (solid lines, measured with AKAR3) and nuclear (dotted lines, measured with AKAR2-NLS) PKA responses elicited by 1 s UV uncaging of cAMP from DMNB-cAMP (10 μ M) in the striatum (left) and in the prefrontal cortex (right). Mean responses are expressed as the percentage of the maximal response to the adenylyl cyclase activator forskolin (fsk), and represent the average response from at least three independent experiments per condition. The shaded area represents the s.e.m.

the major serine/threonine protein phosphatases counteracting PKA effects. We had already reported that protein phosphatase inhibition with cantharidin efficiently prevented the dephosphorylation of AKAR in thalamic intralaminar neurons (Gervasi et al., 2007). In addition, in the striatum, cantharidin efficiently blocks the inhibitory effect of PP1 on the AKAR phosphorylation level (Polito et al., 2015). Here, in the prefrontal cortex, brief (10 s) SKF application in the presence of the non-selective PP1/PP2A inhibitor cantharidin (30 μ M) produced a maximal increase in the nuclear PKA signal that did not return to the baseline following washout of SKF (Fig. 5E). Fostriecin (200 nM), a specific inhibitor of PP2A (Swingle et al., 2009), had very little effect on the nuclear response to brief SKF stimulation compared to cantharidin [Fig. 5F; amplitude

of the response at 800 s = $0.04 \pm 0.02\%$, $N=4$ in control versus $84.78 \pm 6.88\%$, $N=5$ under cantharidin versus 0.18 ± 0.07 , $N=6$ under fostriecin, expressed as % of maximal fsk response; one-way ANOVA: $F(2,12)=45.37$, $P<0.001$, followed by Bonferroni post hoc test]. These data show that protein phosphatase activities, and most likely that of PP1, strongly counterbalance nuclear PKA activity in cortical neurons and prevent transient cAMP signals from being integrated into a nuclear signal.

Computer modeling indicates the critical role played by the balance of PKA and protein phosphatase activities

Computer simulations were then used to analyze how striatal and cortical neurons differed in their integration of a PKA signal. To this

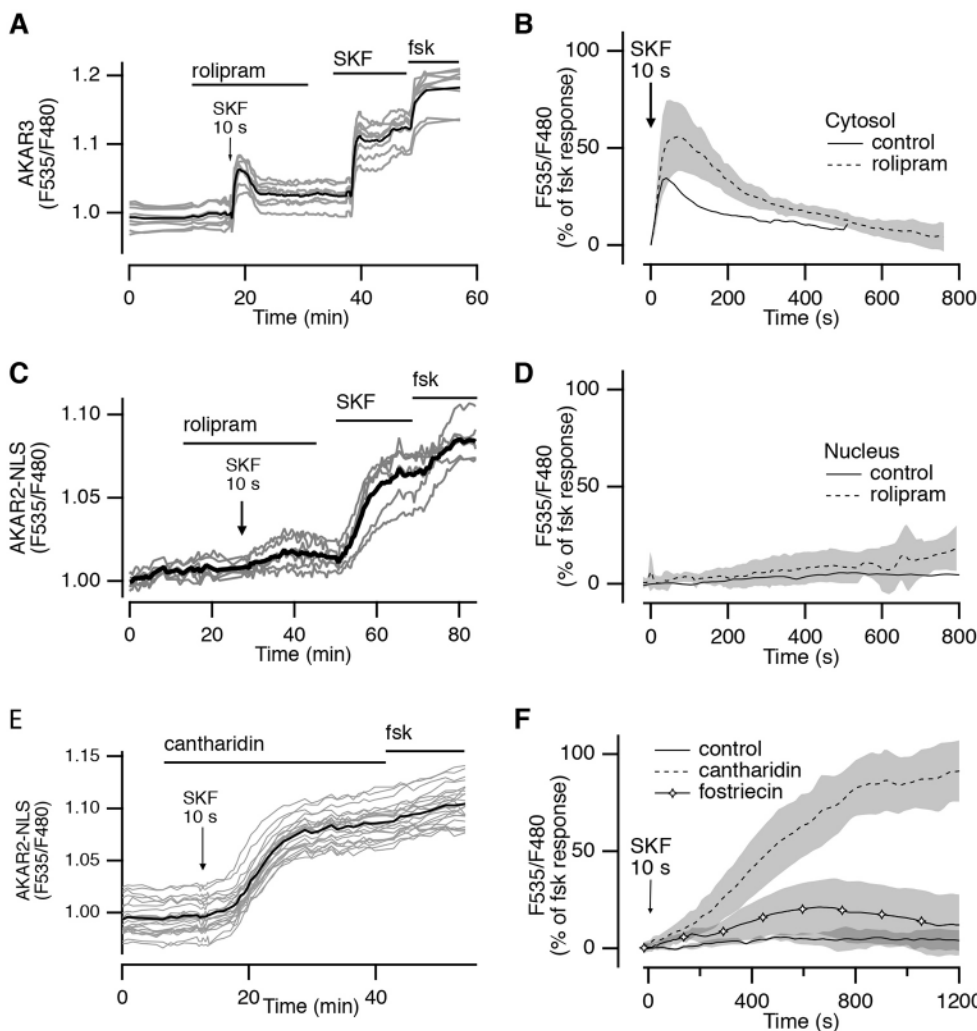


Fig. 5. Phosphatase activity prevents nuclear PKA signaling in the cortex. (A) PKA signal in the cytosol measured with AKAR3 sensor during the 10 s application of SKF (1 μ M), in the presence of the PDE4 inhibitor rolipram (100 nM) in the prefrontal cortex. SKF and fsk (13 μ M) were applied (sustained application) at the end of the experiment. (B) Means of same experiments performed with or without rolipram. (C) Same as A except that the PKA signal is measured in the nucleus with AKAR2-NLS. (D) Means of same experiments performed with or without rolipram. (E) Nuclear PKA responses elicited by a 10 s SKF application in the presence of the phosphatase PP1/PP2A inhibitor cantharidin (30 μ M). Fsk was applied at the end of the experiment to elicit a maximal increase in the ratio change. (F) Averaged responses of the PKA signal to 10 s SKF alone, in the presence of cantharidin or fostriecin (PP2A inhibitor, 0.2 μ M). Average responses are expressed as a percentage of the fsk response, and represent the mean response from at least four independent experiments per condition. The shaded areas represents the s.e.m.

end, we used the experimentally constrained, mass-action kinetics model of cytosolic D₁-dependent cAMP–PKA signaling in striatal MSNs with all its parameters (Yapo et al., 2017) and extended it to the nucleus: this extension included the cyto-nuclear translocation of the catalytic subunit of PKA that phosphorylates nuclear AKAR, which is dephosphorylated by protein phosphatases (Fig. 6A).

The cyto-nuclear translocation of PKA is dictated by passive diffusion (Hagiwara et al., 1993; Harootunian et al., 1993), which was modeled as a first-order reversible reaction with fixed reaction rates (or static translocation rate). Simulating this static translocation rate for cyto-nuclear PKA translocation (Fig. 6A) with transient dopamine input (see Materials and Methods) produced a nuclear AKAR phosphorylation that had a nearly exponential onset kinetics (Fig. 6B, black trace). This onset kinetics was observed in several cell types (Harootunian et al., 1993; Yang et al., 2014) but not in striatal and cortical neurons, which displayed a sigmoidal response onset (Fig. 2). This suggests that PKA cyto-nuclear translocation in neurons involves an additional mechanism that introduces nonlinearity, such as a dynamic translocation rate (Fig. 6B); in this reaction scheme, PKA positively regulates its own translocation rate by changing the state of the nuclear pore via phosphorylation (Fig. 6B, inset). This is consistent with the previously reported

increase in cyto-nuclear translocation mediated by PKA (Mishra and Parnai, 1995). A similar observation was also made previously with respect to the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), where ERK1/2 increases its own nuclear translocation (Shindo et al., 2016). Therefore, we implemented this additional reaction in the model, which led to onset kinetics that matched better the sigmoidicity of cortical and striatal data (compare Fig. 6B with Fig. 2). This reaction scheme for dynamic translocation rate was included in the model for all further simulations.

Striatal neurons exhibit higher levels of PKA than cortical neurons, in particular the RII β type (Brandon et al., 1998; Cadd and McKnight, 1989; Ilouz et al., 2017; Ventra et al., 1996), which we also see in our brain slice preparations from young mice (Fig. S1). We tested whether this difference in PKA level could be a contributing factor to the observed differences between the cortical and striatal nuclear response, and we ran simulations with various initial amounts of PKA. As expected, reducing the PKA levels decreased the nuclear response amplitude (Fig. 6C). A significant reduction in PKA levels (0.2 $\times$) almost fully suppressed the nuclear response towards transient dopamine input, similar to what was observed in the cortex (Fig. 6C). Simulation in that low PKA condition with reduced PDE did not significantly increase the

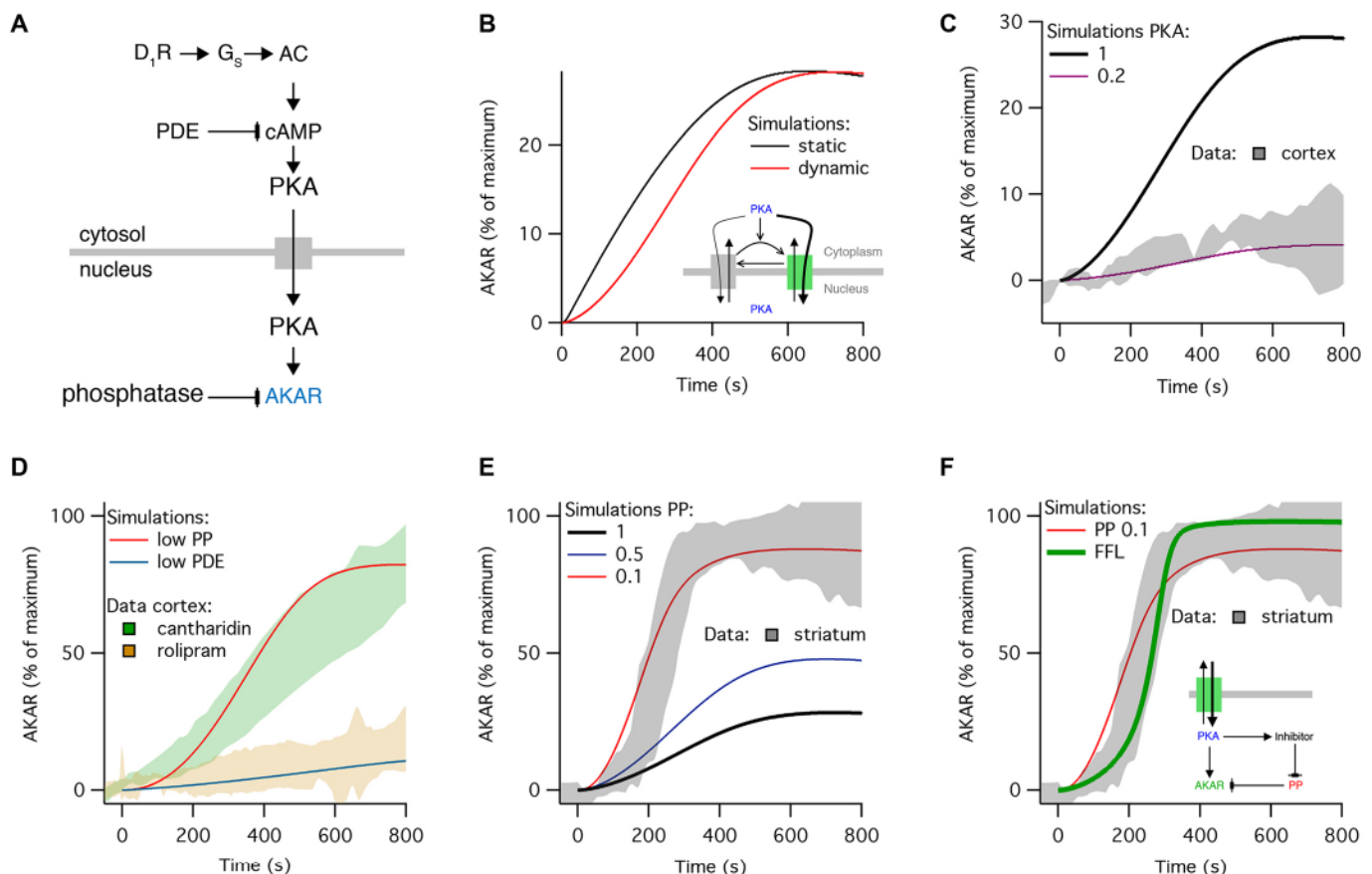


Fig. 6. Computational modeling indicates a PKA-mediated facilitation of nuclear translocation in cortex and striatum, and a positive feed-forward loop in striatal neurons. (A) Modeled signaling pathway for the dopamine-induced AKAR response in the nucleus. (B–F) Simulated AKAR (lines) and measured AKAR2-NLS (gray and colored shaded areas represent mean $\pm$ s.e.m.). (B) Modeling the translocation reaction with a single-static translocation rate (black) or a dynamic translocation rate with PKA increasing its own translocation by phosphorylation of the nuclear pore (red; reaction schematic in inset). All further simulations assume this condition. (C) Simulation of nuclear AKAR response with PKA levels 1 $\times$ (black) and 0.2 $\times$ (purple); response to 10 s SKF measured in the cortex. (D) Simulation of nuclear AKAR response with low PKA (0.2 $\times$) with low protein phosphatase (PP, red) or low PDE (blue); responses to 10 s SKF measured in the cortex with cantharidin (green shade) and rolipram (orange shade). (E) Dopamine input with 1 $\times$ PKA and various protein phosphatases levels (1 $\times$, 0.5 $\times$ and 0.1 $\times$); the response to 10 s SKF measured in the striatum. (F) Simulation of nuclear AKAR response (green trace) with a PKA-dependent protein phosphatase inhibition feedforward loop (FFL) in the nucleus (inset) and 1 $\times$ protein phosphatase level. The red trace is a copy of the red trace in E shown for comparison.

nuclear response (Fig. 6D), consistent with our measures in cortical neurons in the presence of PDE inhibitor (Fig. 5D). On the other hand, suppressing the activity of protein phosphatases in the same condition led to a large nuclear response (Fig. 6D), which looked similar to the cortical responses measured in the presence of protein phosphatases inhibitor (Fig. 5F). The low cytosolic PKA condition of the model thus seems to recapitulate the observations made for the neurons of the prefrontal cortex, suggesting that PKA is a limiting resource responsible for the low nuclear responsiveness in these neurons.

On the other hand, even though the default ($1\times$) PKA level in the cytosol was validated by the cytosolic responses measured in the striatum (Yapo et al., 2017), the simulation output of the model did not match the large amplitude of the observed nuclear responses (Fig. 6C, compare with Fig. 2A). This could be due to the dephosphorylation activity of protein phosphatases (protein phosphatases) in the nucleus, which counteracts PKA-dependent phosphorylation. Thus, we ran simulations with decreasing levels of nuclear protein phosphatases, while keeping the default ($1\times$) PKA level. A 10-fold reduction in protein phosphatases level increased the nuclear response amplitude to a level that matched the amplitude of the response to transient dopamine stimulation (Fig. 6E).

Even though these simulations suggest that very low level of nuclear protein phosphatases is required to reproduce the striatal response, such a low level is inconsistent with the previous report that protein phosphatases are abundantly localized in the nucleus of MSNs (Ouimet et al., 1995). However, striatal MSNs express multiple regulatory proteins, such as DARPP-32 and Inhibitor-1 (PPP1R1A), that form a feed-forward loop (FFL) to transiently suppress protein phosphatase activity in a PKA-dependent fashion: these regulatory proteins are phosphorylated by PKA and thus become potent inhibitors of protein phosphatases (Walaas et al., 2011). With the striatal default protein phosphatase activity ($1\times$) together with this FFL introduced into the nuclear compartment (Fig. 6F, inset), the model produced a nuclear response that was similar to the measured striatal data (Fig. 6F). Furthermore, the kinetic profile of the simulated response with FFL had a closer resemblance with the measured striatal data than the simulated response at low protein phosphatases condition (Fig. 6F). Thus, even though the striatal nucleus may contain high levels of protein phosphatases, a

PKA-dependent protein phosphatase inhibition mechanism could produce a time window of temporarily low protein phosphatase activity during which PKA signaling dominates, which could be a possible explanation for the higher sensitivity of the striatal nuclear response. Such an FFL mechanism may also contribute to the sharp transition from a lack of response to maximal response with only a small increment in cAMP signal, thus producing the off-on switch that we observed in the striatum (Fig. 3).

Taken together, these simulations support the hypothesis that the balance of PKA and protein phosphatase activities could strongly affect the nuclear integration of neuromodulatory signals in neurons, and explain the differences we observed between cortical and striatal nuclear response (Fig. 7A,B). A condition with a low level of PKA that is unable to counteract the nuclear protein phosphatase activity explains the diminished responsiveness of the cortical neurons. By contrast, higher PKA activity together with low protein phosphatase activity, possibly via PKA-dependent protein phosphatase inhibition in the nuclear compartment, could lead to highly sensitive nuclear responses, as observed in the striatum.

DISCUSSION

Signal transduction from the membrane to the nuclear compartment plays a pivotal role in neuronal adaptations associated with long-lasting changes in gene expression (Cohen and Greenberg, 2008; Matamalas and Girault, 2011). Our data obtained from biosensor imaging in brain slices reveal that the dynamics of signal transduction in striatal neurons differ profoundly from those in other cell types, including cortical neurons, with PKA producing fast phosphorylations in the nuclear compartment, in an all-or-none manner. Taken together with computer modeling, our results suggest that this unique striatal feature results from a high PKA to protein phosphatase activity ratio, strongly regulated by a positive feed-forward mechanism.

Nuclear PKA activity usually reflects the cytosolic PKA signal, which is progressively dampened in amplitude and kinetics as it propagates from the membrane through the cytosol and into the nucleus. This has been reported in various cell types (DiPilato et al., 2004; Haj Slimane et al., 2014; Sample et al., 2012; Yang et al., 2014). Neuronal cells provide an additional level of complexity, with cAMP–PKA signals being confined in specific subcellular

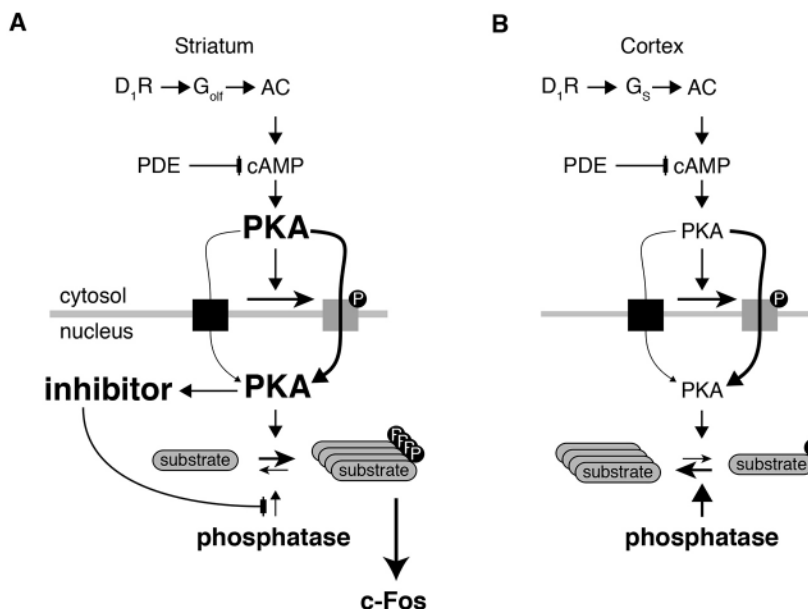


Fig. 7. High PKA level and tight regulation of nuclear phosphatase activity increase responsiveness of striatal neurons to transient dopamine. Transient dopamine input increases cAMP levels and activates cytoplasmic PKA in the striatum (A) and cortex (B). PKA passively diffuses into the nucleus through the nuclear pore. The sigmoidal increase in substrate phosphorylation in the nucleus suggests that PKA activity increases the permeability of the nuclear pore, possibly via phosphorylation. In the cortex, the balance between low PKA level and high phosphatase activity leads to little phosphorylation of intranuclear substrates. In the striatum, a high level of PKA together with a positive feedforward loop involving a phosphatase inhibitor (probably DARPP-32) results in the efficient phosphorylation of nuclear PKA substrates. These specificities of striatal neurons may account for the non-linear integration of PKA signal in the nucleus, allowing for the transduction of transient dopamine signals associated with reward into c-Fos expression.

domains, such as dendrites and axon terminals without affecting other cellular domains (Calebiro and Maiellaro, 2014; Gervasi et al., 2010; Maiellaro et al., 2016). However, signal translocation from the somatic cytosol to the nucleus in neurons seems to follow the general rule of a slow diffusion, as observed in cortical and thalamic neurons with neuropeptide or 5-HT₇ receptor stimulation (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011). Our observations here on cortical neurons are consistent with this theory, showing a slow and gradual nuclear PKA response to D₁ receptor stimulation. Striatal neurons strikingly depart from this classical scheme, with a large PKA signal in the nucleus triggered by correspondingly modest cytosolic responses (Fig. 1). The kinetics of this signal in striatal neurons also differs from the slow integration observed in all other cell types, with a minute increase over ~200 s after receptor stimulation followed by an abrupt rise that reaches the maximal phosphorylation level of the AKAR biosensor in the nucleus. This peculiar temporal profile is observed for all stimulation modalities tested (i.e. stimulation of dopamine D₁ and adenosine A_{2A} receptors, forskolin treatment and cAMP uncaging), showing that this feature is an intrinsic property of cyto-nuclear signal integration and is independent of the origin of the signal. The non-linearity of the nuclear response in the striatum is further illustrated by the switch-like nuclear signal, going abruptly from a lack of response to a maximal response. Again, this lack of intermediate responses was observed with all stimuli and best characterized for very low doses with the D₁ receptor agonist SKF, and contrasted with the wide amplitude spread observed in cortical and other neurons in response to D₁, neuropeptide or 5-HT₇ receptor stimulation (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011). The transduction of cAMP signals from the dendritic arborization into the nucleus of striatal neurons has already been shown to follow a complex non-monotonic dependency as the distance to the cell body increases (Li et al., 2015). In addition, we have previously reported that, compared to cortical neurons, striatal neurons possessed a signaling machinery endowing them with the ability to strongly respond at the cytosolic level to a brief dopamine signal (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2017). In this study, we further reveal another level of integration that boosts the nuclear response to dopamine, again highlighting these striatal neurons as specifically geared to respond to small and/or brief neuromodulatory signals.

Our experiments and computer model simulations highlight the importance of PKA and protein phosphatase activities in determining the net result of PKA action in the nucleus. Low PKA together with tonic protein phosphatase activity prevents nuclear responses in the cortex whereas high levels of PKA and protein phosphatases, together with a positive feed-forward control inhibiting protein phosphatase activity, best matched our observations in the striatum. This model is supported by previous studies showing that the striatum expresses higher levels of PKA compared to the cortex and other brain regions (Brandon et al., 1998; Ventra et al., 1996), as well as by our immunohistochemistry experiments (Fig. S1).

The level of PP1 α is also high in MSNs, and particularly in the nucleus (Ouimet et al., 1995). In order to generate an efficient nuclear response, this high level of PP1 must be efficiently inhibited in a PKA-dependent way. DARPP-32 is the natural candidate mediator of this FFL because it powerfully inhibits PP1 (Fienberg et al., 1998; Girault et al., 2017; Hemmings et al., 1984; Svenningsson et al., 2004). Previously, we have observed that the striatal neurons displayed fast, large and long-lasting cytosolic cAMP–PKA responses to transient dopamine stimulation. Inhibition of the PP1-inhibitory activity through a cytosolic FFL

exerted by DARPP-32 protein strongly contributed to the sensitivity of the striatal response (Castro et al., 2013). Moreover, DARPP-32 can convey information from the cytoplasm to the nucleus, where it contributes to the amplification of drug-induced gene expression through PP1 inhibition (Stipanovich et al., 2008). Further work is needed to clearly demonstrate the contribution of DARPP-32 in the switch-like function described here. Taken together, a high PKA and phosphatase level together with a phosphatase inhibitor like DARPP-32 form a positive FFL, which can produce delayed responses with fast onset and all-or-none responsiveness.

Regulatory PKA subunits have been reported to be localized in the nucleus, such as RI β in the nucleus of cerebellar Purkinje neurons or hippocampal interneurons (Ilouz et al., 2017) and such ‘pre-positioning’ of PKA holoenzyme in the nucleus might speed up the transduction of the cytosolic cAMP signal into a nuclear response. However, the delayed nuclear response that we observed in striatal neurons does not fit with this hypothesis, since cAMP diffuses quickly through the nuclear pore (Sample et al., 2012) and should therefore have induced an instantaneous nuclear signal. Moreover, in another set of our experiments, photorelease of cAMP throughout the cell (the nucleus included) triggered nuclear responses that still displayed the same delayed onset. This indicates that the presence of PKA holoenzyme in the nucleus is an unlikely explanation for the fast and sensitive responsiveness of MSN nuclei. PKA however needs to be located close to the nucleus, and the RII β type, which is the dominant type of PKA in both cortical and striatal neurons, favors the translocation of the signal into the nucleus (Cassano et al., 1996; Paolillo et al., 1999). Tethering of regulatory subunits on A kinase-anchoring proteins (AKAPs) in the cell body has also been shown to play a role in the amplification of the PKA signal in the nucleus (Cassano et al., 1996; Dodge-Kafka and Kapiloff, 2006; Feliciello et al., 1997; Friedrich et al., 2010; Paolillo et al., 1999).

Our combined experimental and modeling approach also highlighted another so-far overlooked property of cyto-nuclear signal transduction. If the translocation of PKA from the cytosol to the nucleus only depended on passive diffusion, signal onset in the nucleus would be expected to display an exponential shape, whereas biosensor measurements with AKAR2-NLS actually reported a sigmoidal shape. We found in our simulations that a possible way to achieve this sigmoidal kinetic profile is if PKA activation facilitates the translocation of its own catalytic subunits into the nucleus. While phosphorylation is widely known to affect active nuclear transport (Christie et al., 2016), passive diffusion has also been suggested to be regulated by PKA (Mishra and Parnai, 1995) and ERK1/2 (Shindo et al., 2016). Our data fit with this latter hypothesis and suggest that the regulation of passive diffusion may play a more important role than anticipated.

Overall, our observations are consistent with signal transduction from the cytosol to the nucleus being limited by the passive diffusion of PKA through the nuclear pore, as reported in a number of cellular systems (Gervasi et al., 2007; Haj Slimane et al., 2014; Harootunian et al., 1993; Martin et al., 2007; Meinkoth et al., 1990; Sample et al., 2012; Yang et al., 2014), with a facilitation of pore diffusion mediated by PKA. Striatal neurons obey to this mechanism, but also feature an additional positive FFL, which provides them with very unusual non-linear properties and a switch-like behavior. We hypothesize that this feature plays an important role in the detection of changes in the extracellular levels of dopamine. The dopamine signals received by striatal neurons cover a wide range of patterns such as tonic release, phasic burst associated with a rewarding event and up to long and sustained

dopamine levels, such as those produced by addictive drugs (Hart et al., 2014; Heien et al., 2005; Howe et al., 2013). With their high sensitivity and all-or-none responsiveness, the nucleus of MSNs can threshold incoming signals, rejecting fast fluctuations of background dopamine level and brief transients, but responding powerfully to dopamine signals lasting for tens to a few hundred seconds. This mechanism may be required for reward-mediated learning, a condition where the detection of moderately long dopamine transients is a critical requirement. This specific striatal feature may also play a critical role in pathology, when abnormal dopamine signals occur, such as those elicited by addictive drugs, as well as with L-DOPA treatment in Parkinson's disease; such signals activate nuclear targets selectively in striatal neurons and might be responsible for the development of drug-seeking behaviors or dyskinesia (Ceric et al., 2013; Girault, 2012). Striatal neurons are equipped with a number of unusual signaling proteins such as $G_{\alpha_{olf}}$, AC5, PDE10, DARPP-32, and end-up featuring an edge-detector filter that binarizes dopamine transitions through non-linear integration, in sharp contrast with cortical neurons, which rather appear as linear integrators of a variety of different neuromodulatory signals, with gradual cytosolic and nuclear responses.

MATERIALS AND METHODS

Brain slice preparation

Wild-type C57Bl/6J mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Mice were maintained in a 12 h light–12 h dark cycle, in stable conditions of temperature (22°C), with food and water available *ad libitum*. All the experiments were performed according to French Ministry of Agriculture and Forestry guidelines for handling animals (decree 87-848).

Brain slices from male mice aged from 7 to 11 days were prepared as previously described (Castro et al., 2010). Briefly, mice were killed by decapitation and the brain was quickly removed. Coronal and sagittal brain slices were cut with a VT1200S microtome (Leica, Germany). Slices were prepared in an ice-cold solution of the following composition: 125 mM NaCl, 0.4 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 5 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose and 1 mM kynurenic acid, saturated with 5% CO_2 and 95% O_2 . The slices were incubated in this solution for 30 min and then placed on a Millicell-CM membrane (Millipore) in culture medium (50% Minimum Essential Medium, 50% Hanks' Balanced Salt Solution, 6.5 g/l glucose, penicillin-streptomycin, Invitrogen). We used the Sindbis virus as a vector to induce expression of the biosensors after overnight incubation (Ehrengruber et al., 1999). The coding sequences of AKAR3 (Allen and Zhang, 2006) and AKAR2-NLS (Zhang et al., 2005) were inserted into the viral vector pSinRep5 (Invitrogen, San Diego, CA), as previously described (Gervasi et al., 2007). Viral particles ($\sim 5 \times 10^5$ particles per slice) were added and slices were incubated overnight at 35°C under an atmosphere containing 5% CO_2 . Before the experiment, slices were incubated for 30 min in the recording solution (identical to the solution used for cutting, except that the Ca^{2+} concentration was 2 mM and kynurenic acid was omitted). During recordings, brain slices were continuously perfused with this solution saturated with 5% CO_2 and 95% O_2 , at 32°C. Most drugs applied on the slices were added in this continuous bath perfusion.

The viability of the neurons in these experimental conditions have been checked by patch-clamp recording, which showed electrical activity to be normal (Castro et al., 2010; Gervasi et al., 2007).

Optical recordings on brain slices

Recordings were made on visually identified medium-sized spiny neurons (MSNs) in the striatum or pyramidal neurons in layer V of the prefrontal cortex (lateral +1.1 mm to 1.56 mm; bregma +1.8 mm to 2.2 mm). In the striatum, neurons were selected for a diameter less than 13 μm , comparable to the size known for MSNs, which constitute 95% of the neurons in the striatum. Larger neurons, presumably cholinergic interneurons, were excluded from analysis. In all recordings, we confirmed the presence of D_1 receptors on the imaged neurons with a pharmacological challenge at the

end of the recording with the D_1 -like agonist SKF-38393. Wide-field images were obtained with an Olympus BX50WI or BX51WI upright microscope with a 20×0.5 NA or a 40×0.8 NA water-immersion objective, and an ORCA-AG camera (Hamamatsu). Images were acquired with iVision software (Biovision, Exton, PA). The excitation and dichroic filters were D436/20 and 455dxt. Signals were acquired by alternating the emission filters, HQ480/40 for the donor and D535/40 for the acceptor, with a filter wheel (Sutter Instruments, Novato, CA). All filters were obtained from Chroma Technology (Brattleboro, VT, USA).

Images were analyzed with custom routines written in the IGOR Pro 7 environment (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). The emission ratio was calculated for each pixel for the ratio of fluorescence at 535 nm to that at 480 nm (F535/F480) for both AKAR biosensors. The pseudocolor images were calculated so as to display the ratio value coded in hue and the fluorescence of the preparation coded in intensity. A calibration square indicates the intensity values from left to right and the ratio values from bottom to top. The size of the square indicates the scale of the image in microns. No correction for bleed-through or direct excitation of the acceptor was applied because we considered the correction coefficients to be potentially unreliable in the brain slice preparations due to differences in optical properties between slices. Bleed-through and direct excitation corrections increase the apparent ratio changes but without improving signal-to-noise ratio (Ducros et al., 2009). The ratio changes in our conditions therefore appear smaller than those reported by other studies in which such corrections were applied.

Dopamine uncaging and fast drug application

Photorelease of dopamine from NPEC-DA was performed using a 360 nm LED source mounted on the epifluorescence port of the microscope, providing 0.7 mW at the exit of the 40× microscope objective (UVEILED, Rapp Optoelectronic, Hamburg, Germany). The UV flash triggers the instantaneous release of free dopamine, which concentration declines with a time-constant of 109 s, as previously described (Yapo et al., 2017). The frequency of data acquisition, usually 1 image pair every 50 s, was increased to 1 pair every 5 s, starting ten data points before dopamine uncaging.

A fast focal application system was used for kinetic studies (Gervasi et al., 2007). A glass pipette (80–120 μm tip diameter) was placed 300 μm to the side of and 200 μm above the brain slice, and ejected the drug contained in the same solution as the bath. The same device was used for the sustained or transient (10 s) application of 1 μM SKF-38393, 1 μM CGS 21680 or 13 μM forskolin+200 μM IBMX. The frequency of data acquisition during the fast drug application was set to 1 pair every 10 s.

Immunohistochemistry

We carried out c-Fos immunohistochemistry with a standard peroxidase-based method (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, UK), using 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) as the chromogenic substrate. The primary c-Fos antiserum was used at a dilution of 1:1000 (rabbit polyclonal antiserum from Santa Cruz Biotechnology). Before immunohistochemistry, brain slices were stimulated with dopamine which was released either by local flash photolysis of NPEC-dopamine (0.1 s or 1 s, in the cortex or striatum) or bath application of forskolin (13 μM , 5 min) in the recording solution. After stimulation and incubation for 90 min at 32°C, brain slices were fixed by overnight immersion in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde at 4°C, pH 7.4. Slices were then rinsed three times in ice-cold phosphate buffer and incubated with an avidin-biotin blocking kit. Positive nuclei were counted by a researcher blind to the experimental conditions, with a 20× water-immersion objective, on four adjacent regions of 1400 μm^2 each, on at least three slices per condition. Immunostaining of the PKA regulatory subunit $\text{RII}\beta$ was performed in brain slices fixed by overnight immersion in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde at 4°C, pH 7.4. Slices were then rinsed three times in ice-cold phosphate buffer containing 2% goat serum, 1% BSA and 0.2% Triton X-100. The primary anti- $\text{RII}\beta$ antibody (BD Transduction Laboratories; cat. no. 610625; 1:500 dilution) was incubated overnight at 4°C. Slices were rinsed and incubated with a secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, ThermoFisher; diluted 1:500) for 2 h at room temperature. As a negative control, the secondary antibody applied

alone (without the primary antibody step) showed no reactivity. Images were acquired with wide-field imaging.

Data analysis

The FRET change in the AKAR3 and AKAR2-NLS biosensors was quantified by ratiometric imaging, with PKA-dependent phosphorylation inducing an increase in the acceptor:donor ratio. The measured acceptor:donor ratio fluctuates between the $R_{\min}$ and $R_{\max}$ values, which correspond to the minimal ratio value (no biological signal) and maximal response (saturated biosensor) (Gryniewicz et al., 1985). The maximal response corresponding to biosensor saturation was determined for each neuron at the end of the recording. This level was determined by applying 13 μM forskolin, sufficient to maximally phosphorylate the highly sensitive probe AKAR3 (Gervasi et al., 2007). The baseline ratio was considered to be close to $R_{\min}$, as shown previously (Polito et al., 2015). Absolute ratio values differed between cells, so the amplitude of the response to receptor stimulation was quantified for each neuron as the fractional change in ratio from its own baseline and maximal final ratio response. In wide-field imaging experiments, some of the signal measured on a region of interest comes from out-of-focus neurons. This has no effect on the kinetics features of the ratio signal, but affects the absolute amplitude of the response when out-of-focus neurons have a pharmacological response different from that of the in-focus neuron. Still, for a given region of interest, the steady-state response to a bath-applied saturating dose (1 μM) of SKF-38393 was genuinely representative of the response of all D_1 -expressing neurons contributing to the signal of this region of interest, and this value was used for normalization in kinetic analyses.

Drugs

NPEC-caged dopamine [(N)-1-(2-nitrophenyl) ethylcarboxy-3, 4-dihydroxyphenethylamine], SKF-38393 hydrobromide, CGS 21680 hydrochloride, rolipram, cantharidin, cyclosporin A, FK 506, fostriecin, and forskolin (fsk) were obtained from Tocris Cookson (Bristol, UK); 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) was obtained from Sigma-Aldrich. DMNB-cAMP (4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate) was from Molecular Probes.

Computational modeling

The signaling cascade related to the D_1 -dependent activation of PKA and its nuclear translocation was modeled as a system of biochemical reactions which contains both reversible and irreversible reactions. Enzymatic reactions were represented as a two-step process in which the first step is a reversible binding between the enzyme and substrate, and the second step is an irreversible transformation of the enzyme-substrate complex into product and thereby releasing free enzyme. Individual reactions were mathematically modeled as ordinary differential equations (ODEs) corresponding to the rate law of mass action kinetics as described previously (Yapo et al., 2017).

The resulting system of ODEs was numerically solved using ode15 s solver provided in the Simbiology toolbox of MATLAB (MathWorks) with a maximum timestep of 0.01 s. Explicit spatial or geometrical aspects were not taken into account in the model. However, the whole signaling volume was divided into two abstract subvolumes or compartments representing cytosol and nucleus and they contain cytosolic and nuclear reactions, respectively. The total volume of the whole reaction space assumed in the model is around $550 \mu\text{m}^3$, which contains a nuclear volume of $\sim 400 \mu\text{m}^3$, resulting in a cytoplasmic volume of around $\sim 150 \mu\text{m}^3$. The cytosolic volume contains the chemical reactions related to D_1 -dependent PKA activation. Briefly, dopamine-dependent D_1 activation leads to an increase in GTP-bound stimulatory G-protein, which in turn activates adenylyl cyclase (AC). AC activation results in the elevation of cAMP, which in turn activates PKA. The cytosolic compartment also contains PDE to degrade cAMP. Active PKA translocates to the nuclear compartment where it could phosphorylate AKAR present in this compartment. The nuclear compartment also contains protein phosphatases which could dephosphorylate AKAR. The intercompartmental PKA translocation is implemented as a first-order reaction. Alternatively, a dynamic forward kinetic rate is used for this reaction to capture the sigmoidal nature of nuclear signal observed in the current data. This dynamic forward

reaction rate for cyto-nuclear PKA translocation assumes that it is positively influenced by the level of active PKA in the cytoplasmic compartment. This PKA dependency is implemented using a chemical species corresponding to a nuclear channel that is phosphorylated by PKA, and the overall forward reaction rate is calculated at each simulation timestep by averaging a low reaction rate weighted by the fraction of the non-phosphorylated form and a high reaction rate weighted by the fraction of the phosphorylated form of the nuclear channel species. An additional PKA-dependent protein phosphatase inhibition reaction scheme in the nuclear compartment was also tested. Biochemical reactions and respective parameters for all these processes in the cytosolic and nuclear compartments, except the PKA translocation and PKA-dependent PP1 inhibition, are directly taken from the recently published reaction-kinetic model of dopamine-dependent cAMP signaling (Yapo et al., 2017). In all the simulations, D_1 receptor is activated with a transient dopamine input that mimics the fast application of saturating level of SKF-38393 in our experimental protocol (10 s SKF-38393 application). This time-varying input is modeled as an instantaneous increase in dopamine to 10 μM followed by an exponential decay with a time constant of ~ 150 s, which reflects the diffusion rate of the drug out of the brain slice (Yapo et al., 2017).

Statistics

At least four neurons were analyzed per brain slice and their responses averaged. 'N' indicates the number of independent experiments (i.e. brain slices), and 'n' indicates the number of cells. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. Differences were considered significant when $P < 0.05$. The probability density (Fig. 3) was estimated using a Gaussian kernel and Silverman's bandwidth selection in Igor Pro 7 (Wavemetrics).

Acknowledgements

We want to thank Mohamed Doulazmi for performing statistical tests. The group of C.Y., P.V. and L.R.V.C. is member of the Bio-Psy Labex

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: C.Y., A.G.N., P.V., L.R.V.C.; Methodology: A.G.N., P.V., L.R.V.C.; Software: A.G.N., P.V.; Validation: C.Y., A.G.N., P.V., L.R.V.C.; Formal analysis: C.Y., A.G.N.; Investigation: C.Y., L.R.V.C.; Data curation: P.V., L.R.V.C.; Writing - original draft: C.Y., A.G.N., P.V., L.R.V.C.; Writing - review & editing: C.Y., A.G.N., P.V., L.R.V.C.; Visualization: C.Y., P.V., L.R.V.C.; Supervision: J.H.K., P.V., L.R.V.C.; Project administration: P.V.; Funding acquisition: J.H.K., P.V.

Funding

This work was funded by 'DIM Cerveau et Pensée IdF 2014', the Association France Parkinson, the European Horizon 2020 Framework Program under grant agreement no. 720270 (Human Brain Project SGA1) and EuroSPIN – an Erasmus Mundus Joint Doctoral program. This work was supported by the Investissements d'Avenir program managed by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) under reference ANR-11-IDEX-0004-02.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.216556.supplemental>

References

- Allen, M. D. and Zhang, J. (2006). Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 716–721.
- Arbuthnot, G. W. and Wickens, J. (2007). Space, time and dopamine. *Trends Neurosci.* **30**, 62–69.
- Beaulieu, J.-M., Espinoza, S. and Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors-IUPHAR Review 13. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1–23.
- Brandon, E. P., Logue, S. F., Adams, M. R., Qi, M., Sullivan, S. P., Matsumoto, A. M., Dorsa, D. M., Wehner, J. M., Mcknight, G. S. and Idzerda, R. L. (1998). Defective motor behavior and neural gene expression in R11beta-protein kinase A mutant mice. *J. Neurosci.* **18**, 3639–3649.
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. and Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* **68**, 815–834.
- Cadd, G. and Mcknight, G. S. (1989). Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* **3**, 71–79.
- Calebiro, D. and Maiellaro, I. (2014). cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Front. Cell Neurosci.* **8**, 350.

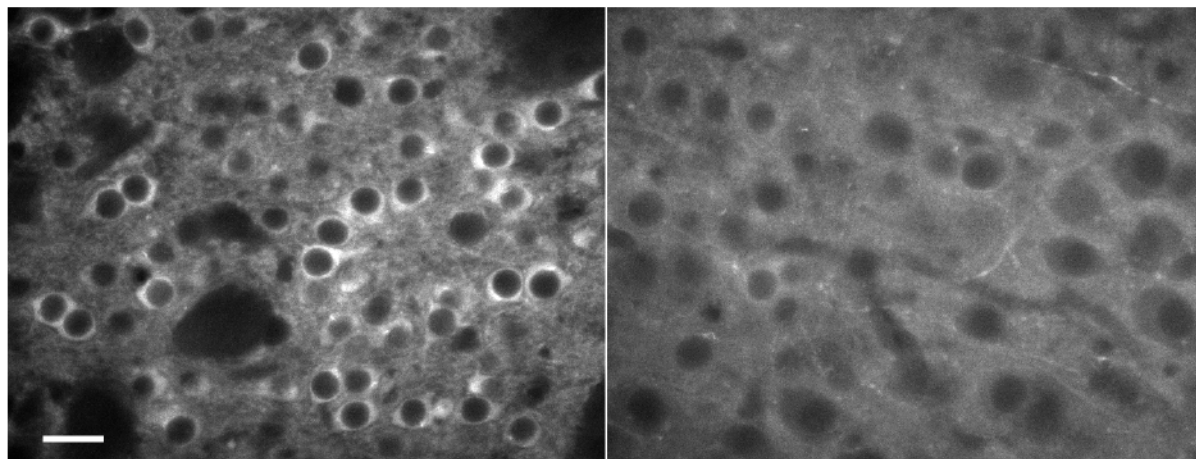
- Cassano, S., Gallo, A., Buccigrossi, V., Porcellini, A., Cerillo, R., Gottesman, M. E. and Arvedimento, E. V. (1996). Membrane localization of cAMP-dependent protein kinase amplifies cAMP signaling to the nucleus in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 29870-29875.
- Castro, L. R. V., Gervasi, N., Guiot, E., Cavallini, L., Nikolaev, V. O., Paupardin-Tritsch, D. and Vincent, P. (2010). Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J. Neurosci.* 30, 6143-6151.
- Castro, L. R. V., Brito, M., Guiot, E., Polito, M., Korn, C. W., Hervé, D., Girault, J.-A., Paupardin-Tritsch, D. and Vincent, P. (2013). Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J. Physiol.* 591, 3197-3214.
- Cerovic, M., D'isa, R., Tonini, R. and Brambilla, R. (2013). Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. *Neurobiol. Learn. Mem.* 105, 63-80.
- Chergui, K., Nomikos, G. G., Mathé, J. M., Gonon, F. and Svensson, T. H. (1996). Burst stimulation of the medial forebrain bundle selectively increases Fos-like immunoreactivity in the limbic forebrain of the rat. *Neuroscience* 72, 141-156.
- Christie, M., Chang, C.-W., Róna, G., Smith, K. M., Stewart, A. G., Takeda, A. A. S., Fontes, M. R. M., Stewart, M., Vértessy, B. G., Forwood, J. K. et al. (2016). Structural biology and regulation of protein import into the nucleus. *J. Mol. Biol.* 428, 2060-2090.
- Cohen, S. and Greenberg, M. E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 183-209.
- Dipilato, L. M., Cheng, X. and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16513-16518.
- Dodge-Kafka, K. L. and Kapiloff, M. S. (2006). The mA/KAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 593-602.
- Ducros, M., Moreaux, L., Bradley, J., Tiret, P., Griesbeck, O. and Charpak, S. (2009). Spectral unmixing: analysis of performance in the olfactory bulb in vivo. *PLoS ONE* 4, e4418.
- Ehrensgruber, M. U., Lundström, K., Schweitzer, C., Heuss, C., Schlesinger, S. and Gähwiler, B. H. (1999). Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7041-7046.
- Feliciello, A., Li, Y., Arvedimento, E. V., Gottesman, M. E. and Rubin, C. S. (1997). A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus. *Curr. Biol.* 7, 1011-1014.
- Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W., Snyder, G. L., Nishi, A., Cheramy, A., O'callaghan, J. P., Miller, D. B. and Cole, D. G. (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281, 838-842.
- Friedrich, M. W., Aramuni, G., Mank, M., Mackinnon, J. A. G. and Griesbeck, O. (2010). Imaging CREB activation in living cells. *J. Biol. Chem.* 285, 23285-23295.
- Gervasi, N., Hepp, R., Tricoire, L., Zhang, J., Lambolez, B., Paupardin-Tritsch, D. and Vincent, P. (2007). Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J. Neurosci.* 27, 2744-2750.
- Gervasi, N., Tchénié, P. and Preat, T. (2010). PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 65, 516-529.
- Girault, J.-A. (2012). Signaling in striatal neurons: the phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106, 33-62.
- Girault, J.-A., Greengard, P. and Nairn, A. C. (2017). Regulation of striatal signaling by protein phosphatases. In *Handbook of Behavioral Neuroscience: Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*, 2nd edn (eds, H. Steiner and K. Y. Tseng), pp. 583-607. Elsevier.
- Graybiel, A. M., Moratalla, R. and Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6912-6916.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootyan, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R. and Montminy, M. R. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 13, 4852-4859.
- Haj Slimane, Z., Bedioune, I., Lechêne, P., Varin, A., Lefebvre, F., Mateo, P., Domergue-Dupont, V., Dewenter, M., Richter, W., Conti, M. et al. (2014). Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 102, 97-106.
- Harlan, R. E. and García, M. M. (1998). Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol. Neurobiol.* 16, 221-267.
- Harootyan, A. T., Adams, S. R., Wen, W., Meinkoth, J. L., Taylor, S. S. and Tsien, R. Y. (1993). Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol. Biol. Cell* 4, 993-1002.
- Hart, A. S., Rutledge, R. B., Glimcher, P. W. and Phillips, P. E. M. (2014). Phasic dopamine release in the rat nucleus accumbens symmetrically encodes a reward prediction error term. *J. Neurosci.* 34, 698-704.
- Heien, M. L. A. V., Khan, A. S., Ariansen, J. L., Cheer, J. F., Phillips, P. E. M., Wassum, K. M. and Wightman, R. M. (2005). Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10023-10028.
- Hemmings, H. C. J., Greengard, P., Tung, H. Y. L. and Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503-505.
- Howard, C. D., Pastuzyn, E. D., Barker-Haliski, M. L., Garriss, P. A. and Keefe, K. A. (2013). Phasic-like stimulation of the medial forebrain bundle augments striatal gene expression despite methamphetamine-induced partial dopamine denervation. *J. Neurochem.* 125, 555-565.
- Howe, M. W., Tierney, P. L., Sandberg, S. G., Phillips, P. E. M. and Graybiel, A. M. (2013). Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards. *Nature* 500, 575-579.
- Hu, E., Demmou, L., Cauli, B., Gallopin, T., Geoffroy, H., Harris-Warrick, R. M., Paupardin-Tritsch, D., Lambolez, B., Vincent, P. and Hepp, R. (2011). VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb. Cortex* 21, 708-718.
- Ilouz, R., Lev-Ram, V., Bushong, E. A., Stiles, T. L., Friedmann-Morvinski, D., Douglas, C., Goldberg, G., Ellisman, M. H. and Taylor, S. S. (2017). Isoform-specific subcellular localization and function of protein kinase A identified by mosaic imaging of mouse brain. *Elife* 6, e17681.
- Kim, M., Park, A. J., Havekes, R., Chay, A., Guercio, L. A., Oliveira, R. F., Abel, T. and Blackwell, K. T. (2011). Colocalization of protein kinase A with adenylyl cyclase enhances protein kinase A activity during induction of long-lasting long-term-potential. *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002084.
- Le Moine, C. and Bloch, B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418-426.
- Li, L., Gervasi, N. and Girault, J.-A. (2015). Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat. Commun.* 6, 6319.
- Maiellaro, I., Lohse, M. J., Kittel, R. J. and Calebiro, D. (2016). cAMP signals in *Drosophila* motor neurons are confined to single synaptic boutons. *Cell Rep.* 17, 1238-1246.
- Martin, B. R., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Taylor, S. S. and Tsien, R. Y. (2007). Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1 α -mediated localization in living cells. *Chem. Biol.* 14, 1031-1042.
- Matamalas, M. and Girault, J.-A. (2011). Signaling from the cytoplasm to the nucleus in striatal medium-sized spiny neurons. *Front. Neuroanat.* 5, 37.
- Meinkoth, J. L., Ji, Y., Taylor, S. S. and Feramisco, J. R. (1990). Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9595-9599.
- Mishra, K. and Parnik, V. K. (1995). Essential role of protein phosphorylation in nuclear transport. *Exp. Cell Res.* 216, 124-134.
- Quimet, C. C., Da Cruz E Silva, E. F. and Greengard, P. (1995). The α and γ 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3396-3400.
- Paolillo, M., Feliciello, A., Porcellini, A., Garbi, C., Bifulco, M., Schinelli, S., Ventura, C., Stabile, E., Ricciardelli, G., Schettini, G. et al. (1999). The type and the localization of cAMP-dependent protein kinase regulate transmission of cAMP signals to the nucleus in cortical and cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6546-6552.
- Polito, M., Guiot, E., Gangarossa, G., Longueville, S., Doulazmi, M., Valjent, E., Hervé, D., Girault, J.-A., Paupardin-Tritsch, D., Castro, L. R. V. et al. (2015). Selective effects of PDE10A inhibitors on striatopallidal neurons require phosphatase inhibition by DARPP-32. *eNeuro* 2, 1-15.
- Sample, V., Dipilato, L. M., Yang, J. H., Ni, Q., Saucerman, J. J. and Zhang, J. (2012). Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat. Chem. Biol.* 8, 375-382.
- Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* 30, 203-210.
- Shindo, Y., Iwamoto, K., Mouri, K., Hibino, K., Tomita, M., Kosako, H., Sako, Y. and Takahashi, K. (2016). Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling. *Nat. Commun.* 7, 10485.
- Stipanovich, A., Valjent, E., Matamalas, M., Nishi, A., Ahn, J.-H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Bami-Cherrier, K., Enslen, H., Corbillé, A.-G. et al. (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* 453, 879-884.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.-A., Nairn, A. C. and Greengard, P. (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269-296.
- Swingle, M. R., Amable, L., Lawhorn, B. G., Buck, S. B., Burke, C. P., Ratti, P., Fischer, K. L., Boger, D. L. and Honkanen, R. E. (2009). Structure-activity relationship studies of fostriecin, cytosol, and key analogs, with PP1, PP2A,

- PP5, and (beta12-beta13)-chimeras (PP1/PP2A and PP5/PP2A), provide further insight into the inhibitory actions of fostriecin family inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 45-53.
- Threlfell, S. and West, A. R. (2013). Review: modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia*. **3**, 137-146.
- Tillo, S. E., Xiong, W.-H., Takahashi, M., Miao, S., Andrade, A. L., Fortin, D. A., Yang, G., Qin, M., Smoody, B. F., Stork, P. J. S. et al. (2017). Liberated PKA catalytic subunits associate with the membrane via myristoylation to preferentially phosphorylate membrane substrates. *Cell Rep.* **19**, 617-629.
- Tritsch, N. X. and Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron* **76**, 33-50.
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G. and Girault, J.-A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* **32**, 538-547.
- Ventra, C., Porcellini, A., Feliciello, A., Gallo, A., Paolillo, M., Mele, E., Avvedimento, V. E. and Schettini, G. (1996). The differential response of protein kinase A to cyclic AMP in discrete brain areas correlates with the abundance of regulatory subunit II. *J. Neurochem.* **66**, 1752-1761.
- Vincent, S. L., Khan, Y. and Benes, F. M. (1993). Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **13**, 2551-2564.
- Walaas, S. I., Hemmings, H. C. J., Greengard, P. and Naim, A. C. (2011). Beyond the dopamine receptor: regulation and roles of serine/threonine protein phosphatases. *Front. Neuroanat.* **5**, 50.
- Yang, J. H., Polanowska-Grabowska, R. K., Smith, J. S., Shields, C. W. and Saucerman, J. J. (2014). PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to β -adrenergic signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **66**, 83-93.
- Yapo, C., Nair, A. G., Clement, L., Castro, L. R., Hellgren Kotaleski, J. and Vincent, P. (2017). Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J. Physiol.* **595**, 7451-7475.
- Zhang, H. T., Huang, Y., Jin, S. L., Frith, S. A., Suvarna, N., Conti, M. and O'donnell, J. M. (2002). Antidepressant-like profile and reduced sensitivity to rolipram in mice deficient in the PDE4D phosphodiesterase enzyme. *Neuropsychopharmacology* **27**, 587-595.
- Zhang, J., Hupfeld, C. J., Taylor, S. S., Olefsky, J. M. and Tsien, R. Y. (2005). Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature* **437**, 569-573.
- Zippin, J. H., Farrell, J., Huron, D., Kamenetsky, M., Hess, K. C., Fischman, D. A., Levin, L. R. and Buck, J. (2004). Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J. Cell Biol.* **164**, 527-534.

Summary: A positive feedforward control loop mediated by the inhibition of nuclear phosphatase activity endows striatal neuron with a supersensitive and all-or-nothing responsiveness to transient dopamine signals.

Funding details

S.No.	Funder name	Funder ID	Grant ID
1	Association France Parkinson	http://dx.doi.org/10.13039/501100008211	
2	Horizon 2020 Framework Program		720270
3	EuroSPIN		
4	Agence Nationale de la Recherche	http://dx.doi.org/10.13039/501100001665	ANR-11-IDEX-0004-02



Supplementary Figure 1.

PKA regulatory subunit RII β is expressed at a higher level in the soma of striatal neurons than in prefrontal cortex neurons.

Representative images of striatal (left) and cortical (right) brain slices labeled with anti-RII β antibodies. Immunostaining shows a high level of RII β in striatal neurons, in particular in the somatic cytosol and proximal dendrites. In the cortex, the intensity of the labeling was much lower and mostly localized in dendrites, with a clear reduction in the somatic cytosol. No positive RII β staining was observed in the nuclei in both striatum and cortex. The same acquisition and display settings were applied for both images; 40x objective; scale bar: 10 μ m; gamma correction: 1.5.

Article 3 (en préparation) : Activité accrue des phosphodiésterases de type 2 et 4 dans le striatum des souris lésées à la 6-OHDA : vers l'identification de nouvelles cibles ou biomarqueurs pour le traitement de la maladie de Parkinson ?

Résumé

Malgré l'espoir de pouvoir prochainement prévenir ou contrer la mort neuronale qui cause la maladie de Parkinson, des efforts doivent être poursuivis pour améliorer la condition des patients chez lesquels la substance noire a déjà dégénérée. Pour cela, comprendre comment les neurones du striatum s'adaptent lors de la déplétion chronique en dopamine, ainsi qu'au cours du traitement à la L-DOPA, est indispensable. Nous utilisons une approche d'imagerie de biosenseurs qui permet de suivre la signalisation AMPc/PKA dans des neurones individuels dans des tranches de striatum provenant de souris modèles de la maladie de Parkinson. Nos résultats préliminaires montrent bien l'hypersensibilité des neurones D1 aux stimulations par la dopamine, décrite dans la littérature. Mais à côté de cette hypersensibilité D1, nous décrivons aussi des adaptations à caractère homéostatique : nous mesurons un rôle fonctionnel accru des phosphodiésterases PDE2 et PDE4. Davantage d'études restent à réaliser pour préciser notamment les mécanismes d'augmentation de ces activités phosphodiésterases et déterminer leurs implications éventuelles dans la physiopathologie de la maladie. Enfin l'hypersensibilité D1 est désignée responsable des complications à long-terme de la dopathérapie (i.e. dyskinésies) chez l'individu parkinsonien. Nous évoquons aussi dans cette étude une hypothèse selon laquelle cibler la PDE2 pourrait corriger l'hypersensibilité D1 et permettre de mitiger les effets indésirables de la L-DOPA.

Introduction

La disparition progressive des afférences dopaminergique au cours de la maladie de Parkinson induit de nombreux changements adaptatifs au niveau de la signalisation intracellulaire dans les neurones épineux du striatum, chez des patients comme dans les modèles animaux (Cole et al., 1994)(Berke et al., 1998)(Santini et al., 2008). Les neurones dopaminergiques présentent *in vivo* une activité électrique régulière responsable de la libération "tonique" de dopamine. Ces neurones déchargent occasionnellement des rafales de

potentiels d'actions, responsables de pics de libération de dopamine (dite "phasique"). Cette dopamine phasique joue un rôle essentiel dans l'apprentissage guidé par la récompense, et la sélection de l'action. La dopamine stimule la production d'AMPc dans les neurones striataux qui expriment les récepteurs de type D₁, tandis qu'elle inhibe sa production dans les neurones qui expriment les récepteurs de type D₂.

Parmi les adaptations qui apparaissent au cours de la maladie de Parkinson, une hypersensibilité de la réponse des récepteurs D₁ a été bien documentée (Nishino et al., 1993)(Corvol et al., 2004)(Tong et al., 2004)(Alcacer et al., 2012). Les stratégies thérapeutiques qui visent à remplacer cette perte de dopamine, comme le traitement par la L-DOPA, conduisent à une activité accrue de la signalisation AMPc/PKA et de ses protéines cibles (DARPP-32, GluR1, ΔFos-B), ce qui perturbe la fonction striatale et conduit progressivement à l'apparition de dyskinésies (Murer et Moratalla, 2011). Le niveau d'AMPc intracellulaire résulte d'un équilibre entre sa synthèse par les adénylates cyclases et sa dégradation par les phosphodiesterases (PDEs). Chez des modèles animaux de la maladie, des niveaux d'AMPc plus élevés ont été mesurés, associés à une diminution des niveaux d'ARNm et de la protéine PDE10A dans le striatum (Giorgi et al., 2008, 2011).

Toutefois, les approches utilisées dans ces études ne permettent pas de préciser le type de neurone dans lequel ces adaptations ont lieu, ni d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ces adaptations sur la dynamique de la signalisation AMPc, en particulier sur les réponses AMPc transitoires. L'analyse des effets neuromodulateurs de la dopamine devrait s'inscrire dans un cadre où l'on distingue le type neuronal (MSNs de type D1 ou D2) et où l'aspect temporel de la signalisation est pris en compte. Le développement d'approches génétiques (e.g. souris transgéniques BAC) a permis d'analyser les spécificités biologiques des deux populations neuronales distinctes (Valjent et al., 2009). L'imagerie de biosenseurs ajoute une dimension temporelle et permet d'analyser, à l'échelle de neurones individuels, les spécificités de la dynamique d'intégration du signal AMPc/PKA, en enregistrant des neurones D1 et D2 individuels (Castro et al., 2013)(Polito et al., 2015). Nous utilisons cette approche pour caractériser la réponse à la dopamine en condition normale et analyser les changements adaptatifs qui surviennent lors de la perte des afférences dopaminergiques, caractéristique principale de la maladie. En particulier, nous étudions le rôle fonctionnel des PDEs dans l'adaptation des réponses AMPc transitoires.

(Figures) Increased PDE2/4 activities in the striatal spiny neurons of the 6-OHDA-lesioned mouse model of Parkinson's disease (en préparation)

Running title : The D1 hypersensitivity in the parkinsonian state is accompanied with increased, homeostatic PDE activities

Authors

Cédric Yapo^{1,2}; Liliana R. V. Castro^{1,2*}; Pierre Vincent^{1,2*}

Author Affiliation

¹CNRS, UMR8256 "Biological Adaptation and Ageing", Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), F-75005 Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris 6), Sorbonne Universités, Paris, F-75005, France. *: equal contribution.

Corresponding author

Pierre Vincent: pierre.vincent@upmc.fr

Description rapide des résultats

- La figure 1 présente notre protocole expérimental : de l'injection intrastriatale de la 6-OHDA pour induire une déplétion chronique en dopamine dans le striatum, aux enregistrements d'imagerie de biosenseurs sur tranche. Un enregistrement d'imagerie type chez la souris parkinsonienne est illustré, montrant encore une fois la ségrégation des réponses D1/D2. Enfin les deux dernières figures présentent la réponse hypersensible des MSNs de type D1 aux stimulations dopaminergiques transitoires dans le striatum parkinsonien (hypersensibilité D1).
- La figure 2 montre que les réponses AMPc stimulées par la forskoline dans les MSNs D1 sont diminuées en condition parkinsonienne, indiquant que l'hypersensibilité D1 s'accompagne aussi d'adaptations à caractère homéostatique.
- La figure 3 montre comment l'inhibition des phosphodiésterases de type 2 et 4 restaure une dynamique normale des réponses AMPc stimulées par la forskoline, suggérant une augmentation de leurs activités en condition parkinsonienne.
- La figure 4 montre comment l'application aiguë d'un donneur de monoxyde d'azote (pour activer la PDE2) permet de réduire l'amplitude des réponses D1 hypersensibles retrouvées dans le striatum parkinsonien, une stratégie thérapeutique envisageable pour la prise en charge des dyskinésies induites par la L-DOPA ?

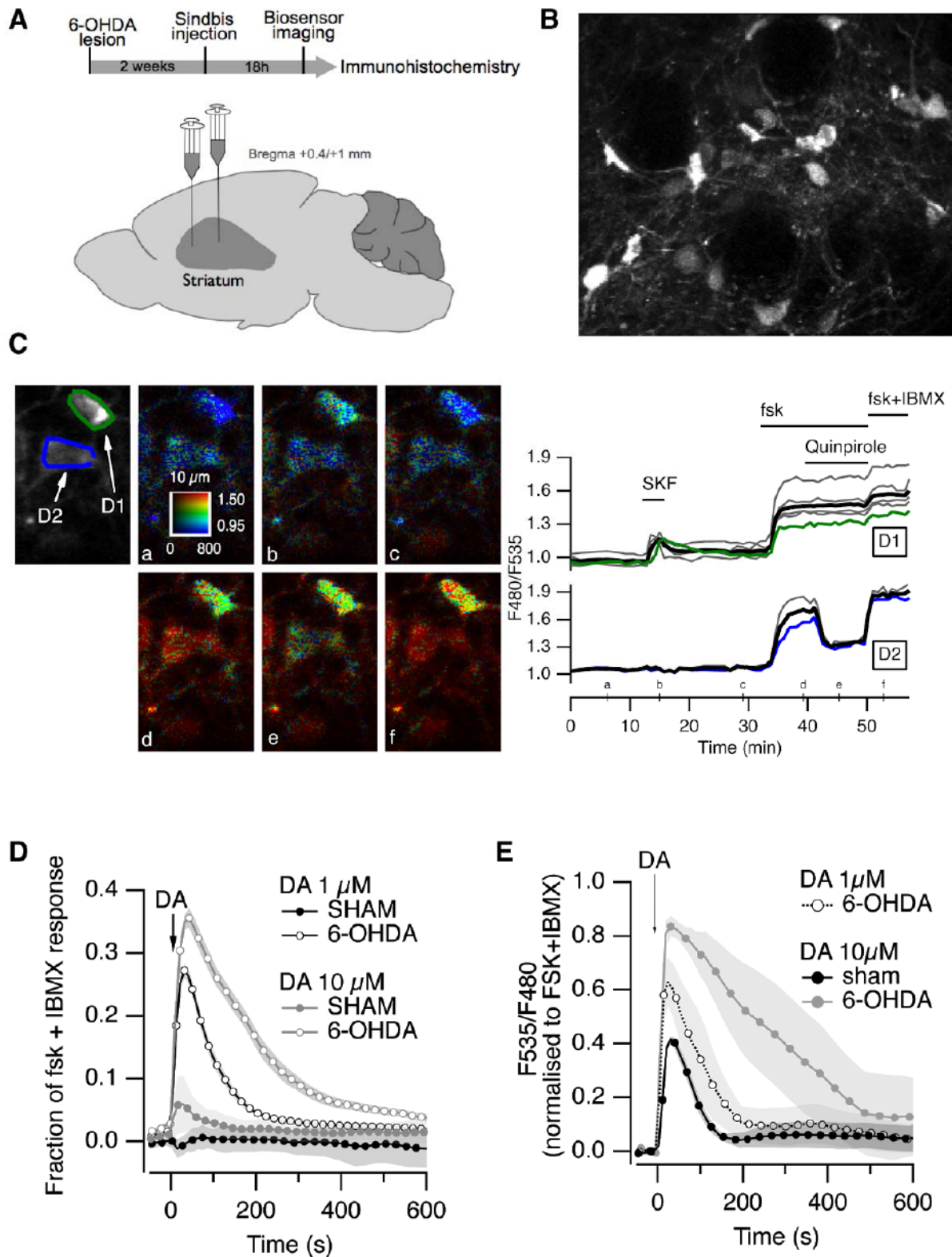


Figure 1: Dopamine hypersensitivity in D1 MSNs of a mouse model of Parkinson's disease.

A) 5-6 week old mice received intrastratial injections (2x 1 μL) of the 6-OHDA neurotoxin to induce the degeneration of the dopaminergic terminals in the striatum of the right hemisphere, a commonly used mouse model of Parkinson's disease. 2 to 3 weeks later, a sindbis virus was injected to make the neurons

express the Epac or AKAR biosensor. The day following the vector injection, acute brain slices were prepared according to our routine protocol, and the cAMP or PKA signals could be monitored with fluorescent microscopy. For each animal, the success of the 6-OHDA lesion was confirmed with a TH immunolabelling.

- B) Striatal slice expressing the Epac-SH150 biosensor for measuring cAMP signals, imaged with a 2photon-microscope.
- C) Two subpopulations of MSNs can be identified with their differential responses to D₁- or D₂-like receptors stimulation. (Left) The first image in grey shows the fluorescence at the acceptor wavelength. The color images show the fluorescence ratio, coded in pseudocolor. (Right) Traces on the graph represent the ratio change over time, measured over the corresponding regions of interest (blue and green) and to other cell bodies contained in the same image stack. Application of the D₁-like agonist (SKF-81297, 100 nM) increases cAMP levels in approximately one half of the neurons imaged, the D1 MSNs. Application of a low dose of the adenylyl cyclase activator forskolin (fsk, 200 nM) increases cAMP in all cells. Subsequent application of the D₂-like agonist quinpirole (1 μ M) decreases the cAMP levels only in the cells that had not responded to the D₁-like agonist, the D2 MSNs. Final application of higher dose of forskoline (13 μ M) together with the non selective PDE inhibitor IBMX (200 μ M) increases the ratio to R_{max}, which is the maximal ratio level, used for quantification of the responses (normalization to R_{max}).
- D) The D1 hypersensitivity in the 6-OHDA mouse measured with the cAMP biosensor Epac-S^{H150}. cAMP responses to dopamine (DA) uncaging are measured in wide field. The uncaging protocol is identical to that described in (Yapo et al., 2017). Responses are normalized to R_{max}. Uncaging of 1 μ M DA produces literally no somatic response in D1 MSNs of the SHAM mouse (grey dotted line), while it increases the ratio to 28% of R_{max} in D1 MSNs of the 6-OHDA mouse. A 10 times higher dose of DA (10 μ M) released via uncaging increase the signal ratio to 5% of R_{max} in D1 MSNs of the SHAM mouse, versus 35% in the 6-OHDA mouse. N= 4-6 slices/condition. Shade represents s.e.m.
- E) Same experiments performed using AKAR4 biosensor to report the PKA-dependent phosphorylation. The D1 hypersensitivity seen at the cAMP level is also observed at the level of PKA in D1 MSNs of the 6-OHDA mouse. Uncaging of 10 μ M DA increases AKAR4 ratio up to 40% of R_{max} in D1 MSNs of the SHAM mouse versus 80% in the 6-OHDA mouse.

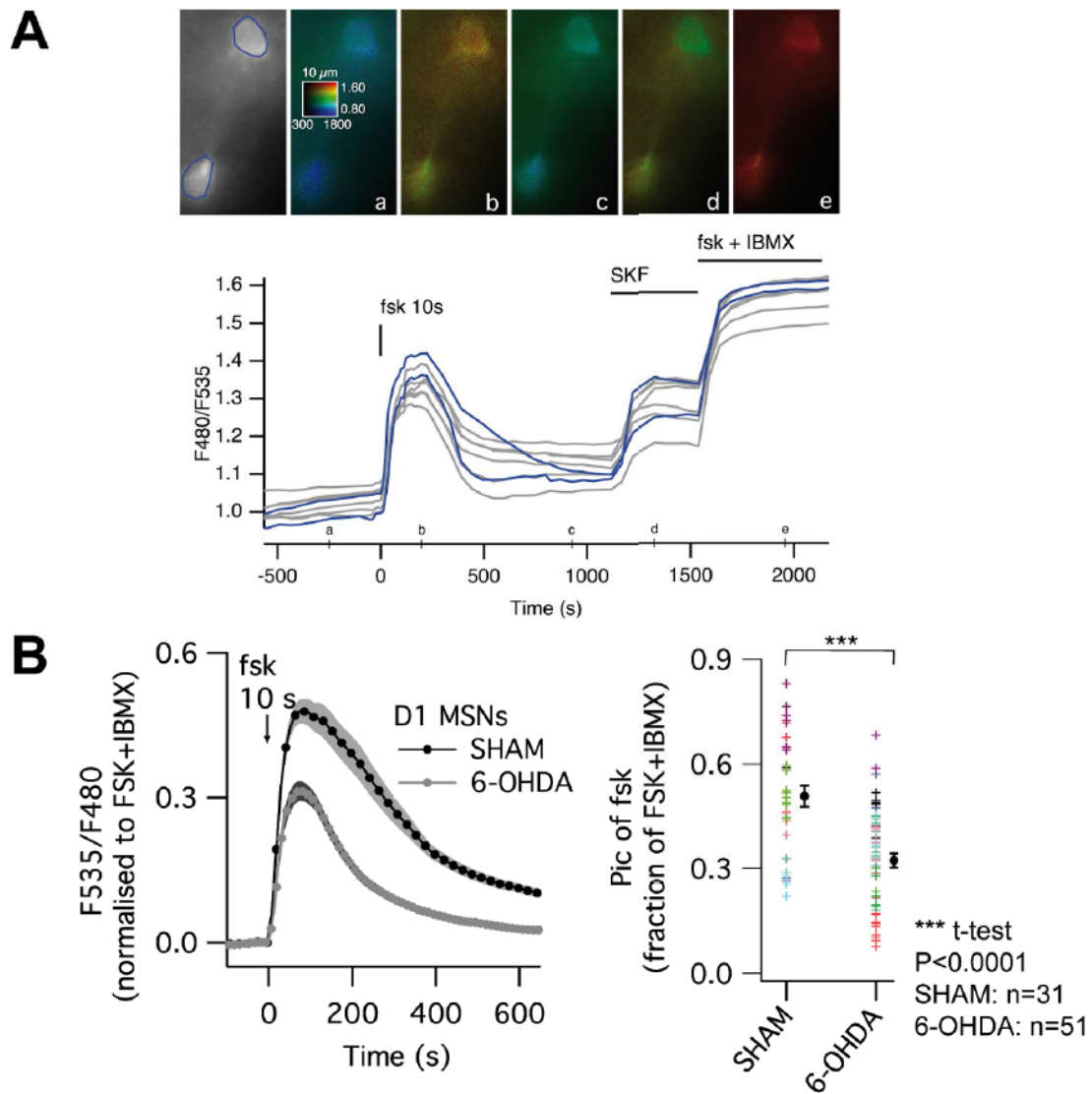
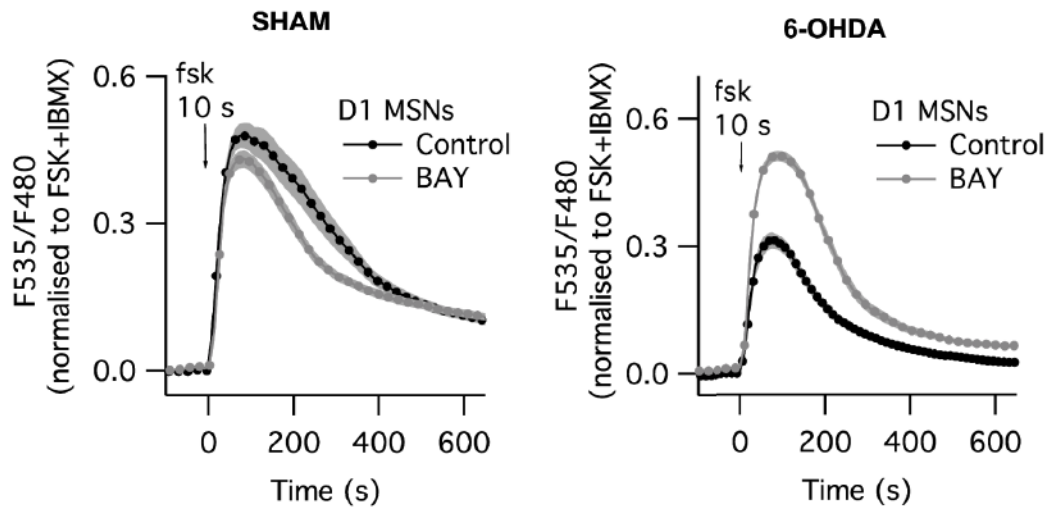


Figure 2 : Decreased cAMP signaling downstream of the D_1 receptor in D1 MSNs of the 6-OHDA-lesioned mouse

- A) Striatal slice from a SHAM-lesioned mouse expressing the Epac-S^{H150} biosensor imaged in wide field. The cells are stimulated with the adenylyl cyclase activator forskolin (fsk, 10 μ M), applied with the microperfusion system device for a duration of 10 seconds (Polito et al., 2013). Following recovery of the response to fsk, application of the D_1 -like agonist SKF-81297 (SKF, 100 nM) reveals the D1 MSNs. Final application of fsk + IBMX is performed to reach Rmax.
- B) Means of the forskolin-induced cAMP responses in D1 MSNs of the SHAM and 6-OHDA mouse, expressed as a fraction of Rmax. The cAMP responses are significantly reduced in the 6-OHDA treated mice: the peak amplitude of the response reaches 30% of Rmax in the 6-OHDA mouse, vs 52% in the SHAM mouse. Shade represents s.e.m. The peak amplitude for each neuron is plotted on the right. n indicates the number of individual neurons.

PDE2



PDE4

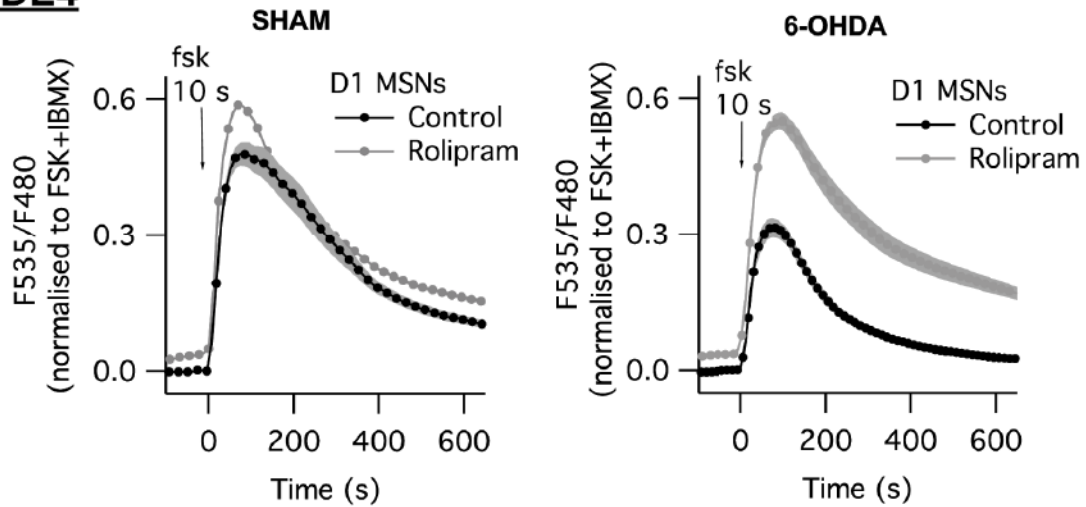


Figure 3: PDE2 and PDE4 downregulate the fsk-stimulated cAMP levels in D1 MSNs of the 6-OHDA-lesioned mouse through PDE2 and PDE4

Each graph represents the average response to 10 s forskolin stimulation in D1 MSNs, in SHAM (left) or 6-OHDA-lesioned mouse (right) with or without pre-application of the PDE2 inhibitor BAY-607550 (BAY, 0.2 μ M, top) or the PDE4 inhibitor rolipram (0.1 μ M, bottom). Inhibition of PDE2 or PDE4 has little effect on the fsk response in the SHAM mouse but efficiently potentiates the response in the 6-OHDA condition.

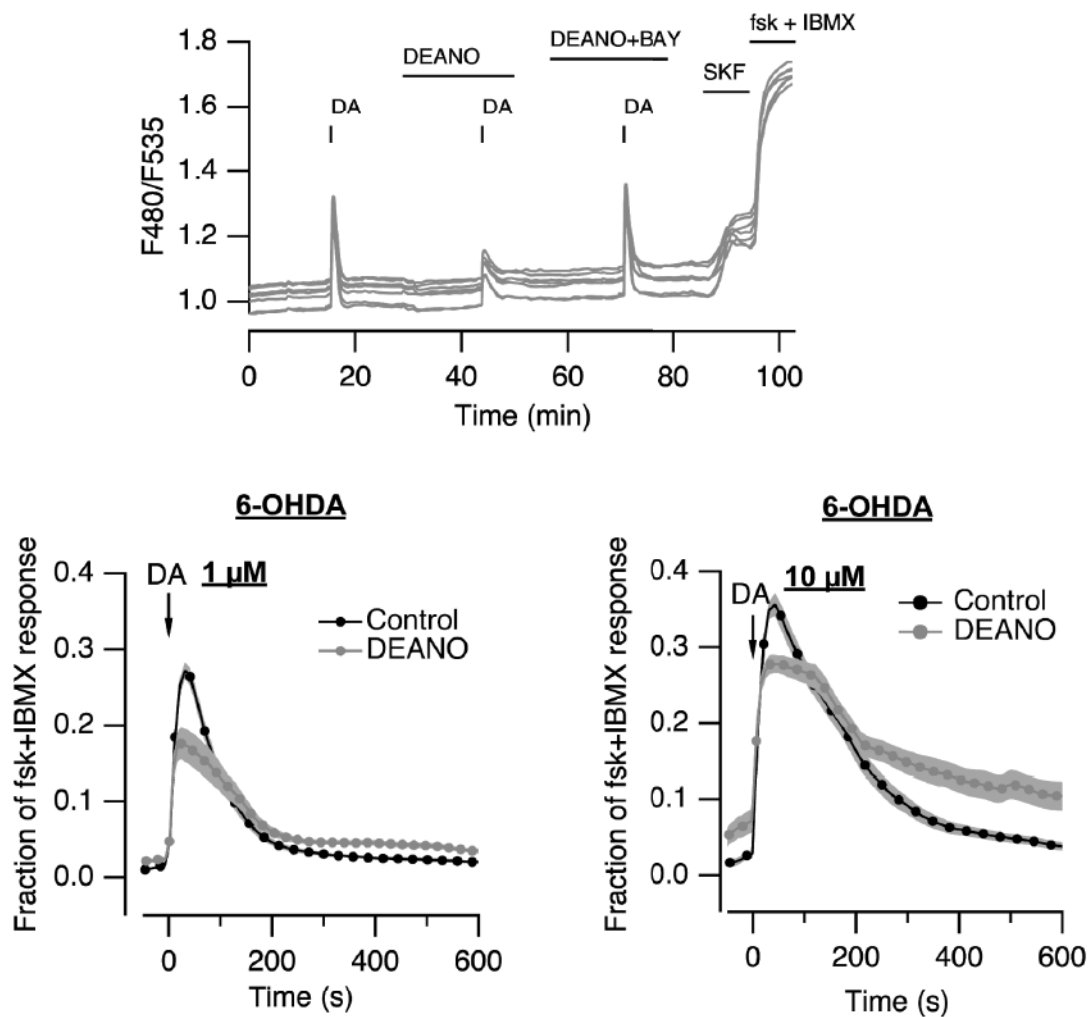


Figure 4: The NO-cGMP pathway decreases the cAMP signal through PDE2 in D1 MSNs in the 6-OHDA-lesioned mouse

Top) Epac-S^{H150} was used with wide field imaging to monitor the cAMP response. A first control dopamine (DA, 1 μ M) uncaging increases the ratio in D1 MSNs. D1 neurons were identified according to their positive response to application of the D₁-agonist at the end of the recording. Then DEANO is applied for ten minutes on the slice, in order to upregulate PDE2 catalytic activity (see Polito et al., 2013). The second DA uncaging trial in the presence of DEANO results in the production of a smaller response. Co-application of DEANO together with the specific PDE2 inhibitor BAY-607550 (BAY, 200 nM) was performed to confirm that DEANO effect on the D₁ response indeed involved PDE2 activation. The D₁-like agonist SKF-81297 was used to identify the D1 MSNs, and a final application of fsk+IBMX was performed to reach R_{max}.

Bottom) Mean cAMP responses to dopamine uncaging (1 and 10 μ M) measured in D1 MSNs of the 6-OHDA mouse, with (grey traces) or without (black traces) pre-activation of PDE2 via DEANO (10 μ M) application : the response amplitude is diminished by approximately one third in the presence of DEANO. With 1 μ M DA (left), the response amplitude drops from 28% to 19% of R_{max}. With 10 μ M DA (right), the response amplitude drops from 35% to 29% of R_{max}. N =2-3/condition, shade represents s.e.m.

Discussion

La dopamine (DA) et ses récepteurs, la signalisation intracellulaire médiée par les nucléotides cycliques (e.g. AMPc) et les enzymes régulant sa dynamique dans les neurones, en particulier les phosphodiésterases (PDEs), sont autant de sujets d'études beaucoup discutés ces dernières décennies en raison de leur importance décrite dans des fonctions et pathologies relevant du contrôle moteur, de la cognition, ou encore de l'affectivité/humeur. La libération de dopamine dans le striatum est un événement clé de l'apprentissage motivé par les récompenses (ou par renforcement positif), et régule de nombreux aspects de la physiologie striatale incluant la plasticité corticostriatale, essentiellement par la voie de signalisation canonique AMPc/PKA (Schultz, 2015; Shen et al., 2008). Des dérégulations de l'activité des récepteurs à la dopamine, et plus globalement de la signalisation AMPc/PKA sont retrouvées dans de nombreuses maladies neuro-psychiatriques telles que la schizophrénie ou la maladie de Parkinson. Des travaux précédents de notre équipe ont montré que les neurones épineux - ou MSNs (*medium-sized spiny neurons*) - de type D1, présentent une sensibilité particulière aux stimuli dopaminergiques transitoires tels ceux associés aux récompenses (Castro et al., 2013). Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la dynamique d'intégration de ces stimuli dopaminergiques transitoires 1) en comparant tantôt la réponse des signaux AMPc/PKA cytosoliques des MSNs de type D1 à celle des MSNs de type D2, 2) puis je me suis intéressé à l'intégration de la réponse dopaminergique dans le compartiment nucléaire, 3) et enfin j'ai étudié le devenir des réponses AMPc/PKA striatales chez la souris modèle de la maladie de Parkinson.

1 : La dopamine phasique détectée par les MSNs de type D1 et D2, un rôle pour les MSNs D2 dans la détection des interruptions en dopamine

Deux modes de libération de la dopamine sont décrits dans le striatum : un mode tonique et un mode phasique. Le mode de libération phasique est associé aux récompenses et processus d'apprentissage par renforcement positif, et dans notre première étude nous avons mesuré les effets des stimuli dopaminergiques transitoires sur les signaux AMPc et PKA dans le cytosol des MSNs de type D1 et D2. Ces derniers expriment de façon ségréguée des récepteurs D₁- ou D₂-like respectivement, canoniquement couplés à la signalisation AMPc/PKA, et l'on décrit

un rôle antagoniste de leurs activités sur les sorties des ganglions de la base (Freeze et al., 2013; Nelson et Kreitzer, 2014). Il est communément supposé que les récepteurs D_1 et D_2 striataux répondent différemment aux modes tonique ou phasique de la signalisation par la dopamine : le mode phasique, qui aboutit à la présence de dopamine en concentration micromolaire dans l'espace extracellulaire, et parfois appelée "dopamine phasique", affecterait préférentiellement l'activité des récepteurs de basse affinité D_1 (K_d de l'ordre du μM), alors que les niveaux plus bas de dopamine extracellulaire activeraient sélectivement les récepteurs D_2 de haute affinité (K_d de l'ordre d'une dizaine de nM) (Richfield et al., 1989; Dreyer et al., 2010; Cumming, 2011). Dans notre étude, les données d'imagerie de biosenseurs montrent que les stimuli dopaminergiques transitoires modulent l'AMPC avec une efficacité comparable dans les deux types de MSNs : EC_{50} estimée à 0,7 μM sur le récepteur D_1 , et EC_{50} estimée à 0,4 μM sur le récepteur D_2 . Cependant dans les MSNs de type D_2 , en aval de l'AMPC, ces mêmes stimuli ne parviennent pas à moduler avec la même efficacité le niveau des phosphorylations médiées par la PKA; une observation intéressante qui souligne que différents échelons d'une même cascade de signalisation peuvent très bien répondre différemment à un même stimulus externe.

L'efficacité de la dopamine sur l'AMPC semble similaire dans les deux types de MSNs striataux, et nos valeurs expérimentales d' EC_{50} sont en accord avec des mesures effectuées dans un certain nombre de préparations neuronales (Enjalbert et Bockaert, 1983; Weiss et al., 1985). Mais elles contrastent avec d'autres études où en particulier plusieurs valeurs d' EC_{50} sont rapportées pour le récepteur D_2 , variant du nanomolaire à plusieurs micromolaires (Albert et al., 1990; Schoffelmeer et al., 1994).

Différentes valeurs d'affinité des récepteurs D_1 et D_2 sont retrouvées dans la littérature, et la variabilité observée dans ces mesures peut être attribuée aux méthodes utilisées pour estimer l'affinité (autoradiographie vs tomographie à émission de positron), et à des différences de conditions expérimentales (Skinbjerg et al., 2012; Cumming, 2011). Par exemple les deux états d'affinité des récepteurs D_1 et D_2 pour la dopamine, et l'équilibre entre ces derniers dépendent des niveaux intracellulaires en GTP, un paramètre difficile à contrôler dans nombre de préparations expérimentales (Richfield et al., 1989; Waelbroeck, 1999). La densité des récepteurs à la membrane dans les systèmes d'expression hétérologue, affecte également l'efficacité mesurée. Enfin l'efficacité dépend aussi de l'intégration en aval du récepteur,

puisque la notion d'affinité ne correspond pas de façon linéaire à l'efficacité fonctionnelle (Kenakin, 2013). Nos données montrent en effet que dans les MSNs de type D1 la dopamine module le niveau des phosphorylations médiées par la PKA avec une meilleure efficacité en comparaison à l'AMPC. C'est l'effet opposé qui est observé dans les MSNs de type D2. Nous avons observé dans ces derniers que l'efficacité des stimuli dopaminergiques transitoires mesurée à l'échelle de l'AMPC diminuait à l'échelle des phosphorylations médiées par la PKA. Et cette efficacité diminue davantage à l'échelle des canaux potassiques GIRK couplés aux protéines G (Marcott et al., 2014). Cela est en accord avec des simulations *in silico* montrant que le récepteur D₂ requiert de fortes concentrations en dopamine pour que le dimère $\beta\gamma$ des protéines G agisse sur les canaux GIRK (Nair et al., 2015). D'autres aspects peu considérés lors des mesures d'efficacité sont la temporalité et les adaptations lentes pouvant affecter le récepteur et sa signalisation durant les longues applications de dopamine. En particulier les paramètres tels que la désensibilisation des récepteurs D₁, dont la demi-vie de présence à la membrane après stimulation est de ~ 7 minutes (Dumartin et al., 2000). La désensibilisation réduit de deux fois l'efficacité de la dopamine, et affecte par la même occasion la production maximale d'AMPC (Kim et al., 2004). De façon inverse, la sensibilisation hétérologue des cyclases couplées au récepteur D₂ pourrait contribuer à la mesure d'une efficacité anormalement augmentée (Watts et Neve, 1996; Watts et al., 1998). Dans notre étude, nous avons minimisé ces risques en utilisant le décaageage de dopamine (élévation rapide des niveaux de dopamine, en l'espace d'une seconde, et clairance en environ 100 s) pour stimuler transitoirement les récepteurs D₁ et D₂ plutôt qu'en continu.

La dynamique des actions de la dopamine au niveau post-synaptique et l'action intégrative des cascades de signalisation sous-tendent de nombreuses propriétés neuronales qui déterminent quels types de signaux neuromodulateurs peuvent être détectés et aboutir à des réponses fonctionnelles (Yagishita et al., 2014; Swapna et al., 2016; Marcott et al., 2014; Arbuthnott et Wickens, 2007). La modélisation nous a aidé à mieux comprendre la complexité de ces propriétés et a permis de répondre à plusieurs limitations expérimentales : 1) raccourcir la durée des stimulations dopaminergiques transitoires (s'approcher davantage de l'échelle des millisecondes rencontrée *in vivo*), 2) déterminer la nature de l'élément diminuant l'efficacité des stimuli transitoires sur les phosphorylations médiées par la PKA dans les MSNs de type D2, 3) et enfin modéliser les réponses des deux types de MSNs lors

d'interruptions du niveau tonique de dopamine comme celles associées à l'omission d'une récompense. Nos principales données sont en accord avec l'idée souvent répandue que les MSNs de type D1 sont des détecteurs de la dopamine associée aux récompenses : ils produisent en effet de large réponses AMPc et PKA aux élévations transitoires des niveaux de dopamine, renforçant l'idée que le système de transduction en aval du récepteur D₁ dans ces neurones est très efficace, et spécifiquement conçu pour permettre la détection de signaux dopaminergiques transitoires (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2017). A la différence des MSNs de type D1, les MSNs de type D2 semblent intégrer les signaux dopaminergiques transitoires avec plus de complexité. Récemment Marcott et collègues en utilisant un système hétérologue de canaux potassiques GIRK, et des enregistrements d'électrophysiologie, démontrent que le récepteur D₂ peut détecter les stimuli phasiques suite à la libération optogénétique de dopamine, mais avec une valeur d'EC₅₀ de 36 μ M (10 μ M en présence de cocaïne), incompatible avec les niveaux de dopamine rencontrés *in vivo* (Marcott et al., 2014). Néanmoins cela fait un argument supplémentaire supportant l'idée que le récepteur D₂ peut décoder les signaux dopaminergiques transitoires dans des échelles de concentrations élevées.

Toutes nos données semblent donc indiquer que dans les MSNs D2, les effecteurs modulés par les protéines G_{i/o} et l'AMPc, tels que les canaux couplés aux protéines G/nucléotides cycliques et les protéines Epac, seraient sélectivement sensibles aux stimuli dopaminergiques transitoires. De plus les récepteurs D₂ des MSNs contribuent aux effets psychomoteurs de la cocaïne, confirmant la sensibilité *in vivo* de ces neurones aux fortes élévations du niveau en dopamine extracellulaire (Kharkwal et al., 2016).

En revanche, le niveau de phosphorylation des cibles de la PKA reste insensible à un signal dopaminergique phasique. Nos simulations désignent la protéine DARPP-32 responsable de l'insensibilité des MSNs de type D2 aux stimulations dopaminergiques transitoires à l'échelle des substrats des protéines PKA/PP1. Dans ces neurones, la phosphorylation de DARPP-32 induite par la stimulation des récepteurs A_{2A} mène à une inhibition forte de la protéine phosphatase PP1, même pour des niveaux d'AMPc résultant d'une activation semi-maximale des récepteurs A_{2A} (Polito et al., 2015). Dans cette situation, bien que les élévations transitoires en dopamine parviennent à réduire efficacement l'AMPc et l'activité PKA dans les MSNs D2, la baisse d'activité PKA n'entraîne pas la déphosphorylation du biosenseur

AKAR. Puisque AKAR est déphosphorylé par la phosphatase PP1, une stimulation dopaminergique courte ne produira d'effet sur ce dernier que si la baisse d'activité PKA est suffisamment longue (plusieurs minutes) pour permettre la déphosphorylation du résidu T34 de la DARPP32, et la désinhibition subséquente de PP1. Or le modèle *in silico* utilisé pour notre étude indique que la désinhibition de PP1 dans les MSNs de type D2 est particulièrement lente, due à une déphosphorylation moindre de DARPP-32. Cela est en accord avec plusieurs observations rapportant un plus grand degré de phosphorylation de la DARPP-32 dans les MSNs de type D2 en comparaison à ceux du type D1 (Nishi et al., 2008). De plus, cette différence explique certainement comment la PKA parvient à phosphoryler efficacement dans les MSNs D2 des cibles telles que les récepteurs GABA_A (Janssen et al., 2009) ou la protéine histone H3 (Polito et al., 2015), même pour de faibles élévations en AMPc.

Les effets de la dopamine sur les MSNs D2 diffèrent aussi suivant les niveaux toniques en dopamine : des faibles niveaux en dopamine tonique ne modulent que modestement la signalisation AMPc/PKA alors que des niveaux toniques suffisamment élevés suppriment l'AMPc. Cette capacité des MSNs D2 à détecter des niveaux toniques en dopamine pourraient permettre la détection des interruptions en dopamine, souvent associées aux omissions de récompense. Puisque les élévations en AMPc potentialisent la synaptogenèse dans les MSNs D2 (Augustin et al., 2014), l'élévation d'AMPc associée aux pauses de dopamine pourrait être un mécanisme par lequel la voie indirecte (No Go) des ganglions de la base serait renforcée. Néanmoins le récepteur D₂ étant couplé aux protéines G_{i/o}, son effet sur l'AMPc dépend de façon critique de l'activité d'autres récepteurs fonctionnels couplés aux protéines G_{olf} : en l'absence d'activité de G_{olf}, ni les élévations en dopamine, ni les interruptions ne peuvent affecter l'AMPc dans les MSNs D2. Enfin d'autres neuromodulateurs dans le striatum peuvent voir leurs niveaux varier de façon dynamique, en particulier l'adénosine, qui dans les MSNs D2 active le récepteur A2A, couplé à la protéine G_{olf} (Cechova et Venton, 2008; Sims et Dale, 2014; Nguyen et al., 2014). Mieux connaître les tenants physiologiques de ces différents signaux neuromodulateurs pourrait permettre une meilleure description des réponses des MSNs D2 à la dopamine.

Malgré de belles avancées sur la compréhension du circuit des ganglions de la base, des précisions de plus en plus nombreuses, un certain nombre de controverses persistent. Alors

que le modèle classique propose un rôle opposé aux modes de signalisation phasique et tonique par la dopamine, et de même pour les activités des voies directe et indirecte dans l'exécution des programmes moteurs, de nouveaux modèles décrivent une intégration plus complexe où l'aspect temporel des signaux est essentiel (Arbuthnott et Wickens, 2007; Nambu, 2008; Cui et al., 2013; Matsumoto et Hikosaka, 2009). Nos données soulignent un niveau de complexité additionnel à l'échelle post-synaptique, où un stimulus peut aboutir à différents schémas d'intégration dans le neurone cible. Au sein de la famille D₂-like, le récepteur D₃, qui présente une affinité encore plus importante pour la dopamine, pourrait changer les modes de détection spécifiquement dans les régions ventrales du striatum (Sokoloff et al., 1990; Sokoloff et Le Foll, 2017). De plus, il serait intéressant d'étudier la réponse d'autres voies de signalisation en parallèle à la voie canonique AMPc/PKA, qui pourraient aussi être sensibles aux différents motifs de signalisation par la dopamine. En particulier les récepteurs à la dopamine sont aussi couplés à la voie β -arrestine/Akt/GSK3 β , qui a reçu beaucoup d'attention ces derniers temps pour son hypothétique lien avec l'efficacité clinique des antipsychotiques (Beaulieu et al., 2005; Del'Guidice et al., 2011; Beaulieu et al., 2015; Brust et al., 2015). La capacité de telles voies de signalisation à distinguer les modes tonique ou phasique de la signalisation par la dopamine reste à préciser. Enfin, des différences locales au niveau de la signalisation à l'échelle du subcellulaire peuvent aussi ajouter un cran supplémentaire de complexité, par exemple les facteurs purement géométriques (compartimentation, rapports surface/volume) jouent un rôle important dans la dynamique d'intégration du signal (Neves et al., 2008; Castro et al., 2010; Gervasi et al., 2010; Li et al., 2015; Maiellaro et al., 2016).

Il semble que les systèmes de signalisation D1/D2 fluctuent *in vivo* sous l'influence des changements continus en dopamine, adénosine et acétylcholine (Threlfell et al., 2010, 2012; Nair et al., 2015), sérotonine (Tanaka et al., 2007), ou en monoxyde d'azote (Threlfell et West, 2013; Polito et al., 2013). Notre modèle dépeint le système D2 comme un système compris entre différents comportements de détection : des changements modestes dans les niveaux de ces neuromodulateurs, en poussant les MSNs D2 vers un mode détecteur d'élévations ou des niveaux toniques pourraient générer des différences profondes dans la réponses des MSNs à la dopamine. Puisque la signalisation AMPc/PKA est importante pour la potentiation des synapses corticostriatales, ces résultats soutiennent la possibilité que la

perception de récompenses inattendues renforce les réponses des neurones de la voie directe (MSNs de type D1), alors que l'omission d'une récompense renforce les réponses de la voie indirecte (MSNs de type D2), en accord avec une hypothèse déjà formulée sur les mécanismes de l'apprentissage par renforcement (Maia et Franck, 2011).

2 : Intégration du signal PKA nucléaire dans les MSNs D1 : un mécanisme de contrôle positif qui facilite l'intégration des signaux dopaminergiques

La PKA dans les neurones est connue pour son importance dans la régulation de l'expression génique (Cohen et Greenberg, 2008), mais les spécificités de sa signalisation dans le noyau des neurones striataux restent peu documentées (Matamales et Girault, 2011). Notre équipe avait déjà observé que la signalisation PKA était très sensible dans le cytosol des MSNs (Castro et al., 2013), en particulier aux stimuli dopaminergiques transitoires. Dans la continuité de ces premiers travaux, nous avons aussi montré, utilisant un biosenseur AKAR adressé au noyau, que cette sensibilité se retrouvait augmentée à l'échelle des signaux PKA nucléaires. Les résultats du deuxième article montrent que la stimulation transitoire des récepteurs D₁ striataux déclenche dans le noyau des élévations ultra-sensibles du niveau des phosphorylations médiées par la PKA. Notamment, pour la même durée et intensité de stimulation des récepteurs (décageage de dopamine), l'amplitude des réponses PKA nucléaires en comparaison aux réponses cytosoliques est encore plus importante. Par ailleurs ces stimuli induisent efficacement la transduction du gène précoce c-fos, comme le font les drogues d'abus (Graybiel et al., 1990; Harlan et Garcia, 1998).

En apportant encore une fois des données de modélisation à nos données d'imagerie, nous avons décrit l'existence dans ces neurones d'un mécanisme de contrôle positif des signaux PKA nucléaires, qui déplace l'équilibre des phosphorylations/déphosphorylations via l'inhibition des phosphatases; la protéine DARPP-32 (inhibiteur endogène de la phosphatase PP-1) étant présentée comme possible candidat de ce mécanisme.

L'activité PKA nucléaire reflète généralement le signal PKA cytosolique, progressivement atténué en amplitude et en durée au fur et à mesure de sa progression de la membrane plasmique vers le cytosol, puis du cytosol vers le noyau. C'est un schéma observé dans de nombreux types cellulaires, comme les fibroblastes ou les cardiomyocytes (Hagiwara et al.,

1993; Harootunian et al., 1993; DiPilato et al., 2004; Haj Slimane et al., 2014; Sample et al., 2012; Yang et al., 2014). Cependant la signalisation dans les neurones présente la particularité d'être fortement compartimentée, notamment dans des domaines subcellulaires comme les dendrites ou les terminaisons axonales (Calebiro et Maiellaro, 2014; Gervasi et al., 2010; Maiellaro et al., 2016). La transduction des signaux AMPc des dendrites vers le noyau des MSNs suit des règles complexes, fonction non monotone décroissante de la distance au corps cellulaire (Li et al., 2015). Cependant dans les neurones du cortex et du thalamus, la transduction des signaux neuromodulateurs depuis le cytosol vers le noyau procède suivant la règle générale de diffusion lente (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011). Dans notre étude, les neurones du cortex semblent aussi répondre à ce schéma classique de transduction, en produisant des réponses PKA nucléaires lentes et graduelles suite à la stimulation des récepteurs D_1 . Cependant les neurones du striatum se démarquent clairement de ce schéma, en produisant des réponses PKA nucléaires robustes, résultant pourtant de réponses PKA cytosoliques modestes. Ces signaux PKA nucléaires dans les MSNs se distinguent par leur latence (environ 120 secondes) et leur démarrage abrupt après la stimulation des récepteurs D_1 . La cinétique de la réponse PKA nucléaire striatale, si particulière, est observée pour différentes modalités de stimulation, e.g. stimulation des récepteurs D_1 ou A_{2A} , applications de forskoline, décaageage d'AMPc, soulignant que cette caractéristique est une propriété intrinsèque de l'intégration du signal cytonucléaire dans le striatum, indépendamment de l'origine du signal. La non-linéarité de la réponse nucléaire striatale est singulière par un autre aspect : les stimulations continues du récepteur D_1 par de faibles doses d'un agoniste produisent dans l'ensemble des réponses PKA nucléaires de profil "tout-ou-rien", c'est-à-dire soit absentes, soit d'amplitude maximale. Ceci contraste avec les neurones du cortex préfrontal et autres types neuronaux, où les augmentations d'AMPc se traduisent en revanche par des réponses PKA nucléaires graduelles (Gervasi et al., 2007; Hu et al., 2011). Alors que les neurones striataux possèdent des caractéristiques les rendant capables de répondre avec une grande efficacité aux stimuli dopaminergiques transitoires dans le cytosol (Castro et al., 2013; Yapo et al., 2017), nous avons illustré une autre spécificité des MSNs, en décrivant l'existence d'un mécanisme d'intégration qui potentie les réponses nucléaires, en particulier les réponses à la dopamine, soulignant encore une fois la spécificité des MSNs striataux vis-à-vis de leur sensibilité aux signaux neuromodulateurs brefs.

Nos expériences et simulations de modélisation soulignent l'importance de la balance entre les activités PKA et phosphatases dans la régulation des niveaux de phosphorylations (activité PKA nette) : dans le cortex, une faible activité PKA (voire une faible expression) associée à des activités phosphatases toniques non nulles empêchent la production de réponses PKA nucléaires, alors que dans le striatum (neurones D1), des niveaux/activités de PKA et phosphatases plus importants, associés à un mécanisme inhibant l'activité des phosphatases semblent être responsables des réponses striatales observées. Notre modèle est supporté par différents résultats d'études montrant que le striatum exprime des niveaux de PKA plus élevés que le cortex et autres régions cérébrales (Ventra et al., 1996; Brandon et al., 1998; Ilouz et al., 2017), y compris par nos données d'immunohistochimie.

La phosphatase PP1 α est présente en grande quantité dans les MSNs, y compris dans le noyau (Ouimet et al., 1995). Pour produire des réponses nucléaires efficaces, ces niveaux de PP1 doivent être inhibés, suivant un mécanisme sollicitant la PKA. La protéine DARPP-32, en sa qualité d'inhibiteur de PP1, est le candidat naturellement désigné par nos expériences de modélisation pouvant exercer ce contrôle sur les réponses PKA nucléaires (Fienberg et al., 1998; Hemmings et al., 1984; Sveningsson et al., 2004). Dans des travaux précédents, nous avons observé que les neurones striataux produisaient des réponses AMPc/PKA cytosoliques rapides, robustes, et durables suite à la stimulation transitoires des récepteurs D₁. L'inhibition de l'activité phosphatase PP1 exercé par DARPP-32 contribue beaucoup à la sensibilité/amplitude des réponses striatales (Castro et al., 2013). De plus la protéine DARPP-32 peut véhiculer les informations depuis le cytosol vers le noyau, où elle contribue à l'amplification des inductions de gènes par les drogues via inhibition de l'activité PP1 (Stipanovich et al., 2008). Plus d'expériences sont requises pour clairement démontrer la contribution de DARPP-32 dans la fonction de switch "tout-ou-rien" décrite dans notre étude. C'est donc l'ensemble hauts niveaux de protéine et d'activité PKA, une forte expression de la phosphatase avec la présence d'un inhibiteur de phosphatase comme DARPP-32, qui permet un contrôle positif des réponses PKA nucléaires, une cinétique d'élévation rapide, et un profil de réponse tout-ou-rien.

Certaines sous-unités de la PKA sont parfois localisées dans le noyau, à l'instar de la sous-unité RI β dans les cellules de Purkinje du cervelet ou dans les interneurons hippocampiques (Ilouz et al., 2017). Une pré-localisation de la PKA dans le compartiment nucléaire pourrait expliquer la vitesse anormalement élevée des réponses PKA nucléaires observées dans le striatum, suite à la propagation des signaux AMPc cytosoliques. Cependant la réponse nucléaire retardée que l'on observe dans les neurones striataux n'est pas en total accord avec cette hypothèse puisque l'AMPc, capable de diffuser rapidement à travers les pores nucléaires (Sample et al., 2012), devrait entraîner l'apparition de réponses nucléaires immédiates, comme celles produites dans le cytosol. De plus même avec le décaageage d'AMPc à travers la cellule (noyau compris) les réponses PKA nucléaires sont produites avec une cinétique de montée qui demeure retardée, infirmant l'hypothèse d'un pool nucléaire de PKA striatale. Néanmoins, la PKA doit être localisée à proximité du noyau, et la sous-unité RI β de la PKA, qui prédomine dans les neurones striataux et corticaux, favorise la translocation des signaux intracellulaires vers le noyau (Cassano et al., 1996; Paolillo et al., 1999). L'interaction des sous-unités régulatrices de la PKA avec les protéines d'ancrage de la protéine kinase A (AKAPs) dans le corps cellulaire est également décrite importante dans l'amplification du signal PKA vers le noyau (Cassano et al., 1996; Dodge-Kafka et Kapiloff, 2006; Feliciello et al., 1997; Friedrich et al., 2010; Paolillo et al., 1999).

Notre approche combinée d'imagerie avec la modélisation souligne aussi une autre propriété souvent négligée de la transduction cyto-nucléaire : si la translocation de la PKA du cytosol vers le noyau dépendait uniquement d'un processus de diffusion passive, la montée du signal dans le noyau devrait se superposer à une courbe exponentielle, alors que nos données d'imagerie avec AKAR2-NLS rapportent une montée de type sigmoïdale. Pour que le modèle *in silico* puisse reproduire les observations expérimentales, nous avons formulé une hypothèse selon laquelle l'activation de la PKA faciliterait la translocation des sous-unités catalytiques vers le noyau. En effet les réactions de phosphorylation peuvent faciliter le transport nucléaire de nombreuses protéines (Christie et al., 2016), comme par exemple la protéine ERK (Mishra et Parnaik, 1995; Shindo et al., 2016). Nos données suggèrent cette hypothèse pour la transduction cytonucléaire du signal PKA dans le striatum.

Dans l'ensemble, nos observations sont en accord avec l'idée que la transduction du signal depuis le cytosol vers le noyau est essentiellement limitée par la diffusion passive des sous-unités catalytiques de la PKA à travers l'enveloppe nucléaire, comme rapporté dans de nombreux systèmes cellulaires, neuronaux ou autres (Meinkoth et al., 1990; Harootunian et al., 1993; Gervasi et al., 2007; Martin et al., 2007; Haj Slimane et al., 2014; Sample et al., 2012; Yang et al., 2014). Notre étude suggère que pour les neurones striataux la dynamique d'intégration est différente : une diffusion facilitée de la PKA vers le noyau, et en parallèle un contrôle "doublement négatif" via la DARPP-32 et la PP1, leur confère des propriétés d'intégration non linéaires et rares, probablement à l'origine du comportement tout-ou-rien des réponses PKA nucléaires. Nous pensons que cette particularité joue un rôle déterminant dans la détection des changements de niveaux extracellulaires en dopamine, affectés par les différents modes de dépolarisation des neurones dopaminergiques, et par la prise de drogues pouvant augmenter de façon soutenue et durable les niveaux de dopamine, comme la cocaïne ou les amphétamines (Hart et al., 2014; Heien et al., 2005; Howe et al., 2013). Avec leur sensibilité accrue et leur profil de réponse tout-ou-rien, les neurones du striatum peuvent au niveau nucléaire filtrer/seuiller les signaux afférents, rejetant par exemple les fluctuations brèves des niveaux toniques en dopamine, mais répondant fortement aux signaux dopaminergiques allant d'une dizaine de secondes à plusieurs centaines de secondes; un mécanisme probablement sollicité dans les processus d'apprentissage motivé par la récompense. Les neurones striataux, équipés d'un grand nombre de protéines de signalisation uniques telles que G_{olf} , AC5, PDE10, DARPP-32, possèdent ainsi une capacité de filtrage qui binarise les réponses à la dopamine via des mécanismes d'intégration non linéaires, en contraste avec les neurones du cortex qui eux apparaissent être des intégrateurs linéaires d'une variété de signaux neuromodulateurs, produisant des réponses cytosoliques et nucléaires très graduelles.

3 : Devenir des propriétés intégratives des MSNs en pathologie

Nos deux premières études soulignent comment les neurones D1 et D2 du striatum, cible majeure de la dopamine dans le cerveau, sont capables de traiter de façon tout à fait singulière les différents modes de signalisation par la dopamine, en particulier celui impliqué dans l'apprentissage motivé par la récompense (Yapo et al., 2017; Yapo et al., 2018). Nos résultats montrent en particulier que la balance entre les activités kinases/phosphatases en aval des

récepteurs D₁ ou D₂ striataux régule deux aspects clés de l'intégration du signal au sein du neurone : la conversion des signaux AMPc en des signaux PKA efficaces, permettant par exemple de réguler l'activité électrique des neurones sur des échelles de temps courtes, puis leur propagation efficace du cytosol vers le noyau, là où est initiée la mise en place des adaptations au long cours. Cette balance dynamique pourrait également jouer un rôle critique en pathologie. Par exemple les drogues d'abus et la thérapie à la L-DOPA du patient parkinsonien, qui élèvent de façon anormale les concentrations extracellulaires en dopamine, activent fortement dans les MSNs des cibles nucléaires responsables du développement au long cours des comportements de dépendance ou des dyskinésies induites par la L-DOPA (Cerovic et al., 2013; Girault, 2012). Il serait intéressant de voir si le mécanisme de "contrôle en avant" des signaux PKA nucléaires que nous avons décrit dans les MSNs contribue aussi à l'action délétère de ces substances dopaminomimétiques.

Quid des propriétés intégratives des MSNs dans la maladie de Parkinson, lorsque le striatum doit faire face à une déplétion chronique en dopamine (Hornykiewicz et Kish, 1987; Hornykiewicz, 2001, 2017) ? La plupart des modèles pathophysiologiques et métaboliques de la maladie de Parkinson indiquent l'apparition d'un déséquilibre entre les activités des voies directe et indirecte du circuit des ganglions de la base : la voie indirecte devient fonctionnellement hyperactive, alors que la voie directe devient hypoactive (Albin et al., 1989; Freeze et al., 2013; Nelson et Kreitzer, 2014). Additionnellement, plusieurs adaptations cellulaires, affectant la morphologie (Day et al., 2006; Zhang et al., 2013), l'excitabilité et la plasticité synaptique (Day et al., 2008; Chan et al., 2012; Picconi et al., 2003; Fieblinger et al., 2014; Thiele et al., 2014), mais aussi la signalisation intracellulaire des MSNs sont décrites. Les travaux menés pendant la thèse chez la souris parkinsonienne (résultats préliminaires, article 3) ont permis de retrouver un certain nombre d'altérations déjà décrites dans la littérature, en particulier l'hypersensibilité des neurones D1 à la dopamine, une altération qui contribue à l'émergence des dyskinésies induites par la L-DOPA (Calabresi et al., 2008), et dont nous avons caractérisé la conséquence fonctionnelle sur l'intégration des stimuli dopaminergiques transitoires (intégration encore plus efficace). Enfin nous avons aussi découvert des adaptations nouvelles, à l'échelle de la régulation par les phosphodiesterases, qui n'avaient jusqu'alors pas pu être révélées par les approches de biochimie plus classiques (Giorgi et al., 2008, 2011; Heiman et al., 2014). Davantage de

travaux sont encore à réaliser, pour préciser notamment les implications directes des adaptations que nous avons révélées dans la physiopathologie de la maladie, et éventuellement tester leur potentiel thérapeutique.

Conclusion générale et perspectives

La dopamine régule de façon critique l'activité neuronale dans différentes régions du cerveau et des dysfonctionnements dans la signalisation dopaminergique sont décrites dans de nombreuses affections du SNC comme la schizophrénie ou la maladie de Parkinson. Dans le striatum, la dopamine joue un rôle particulier de marqueur temporel d'un événement important, mécanisme à la base de l'apprentissage basé sur la récompense. Des travaux précédents de l'équipe indiquaient la sensibilité particulière des signaux PKA cytosoliques dans les neurones de type D1 aux stimuli dopaminergiques transitoires tels ceux associés aux récompenses (Castro et al., 2013) : mon travail de thèse s'est inscrit dans la continuité de ces travaux, et a notamment décrypté les propriétés intégratives complexes de la réponse à la dopamine dans un contexte physiologique pertinent, du point de vue cellulaire. J'ai montré que les neurones D2 sont aussi sensibles que les neurones D1 à des signaux dopaminergiques élevés et transitoires, mais l'effet en aval sur la phosphorylation des cibles de la PKA est contrôlé par la protéine DARPP-32 qui inhibe l'action de la phosphatase. Un contrôle par la DARPP-32 est également responsable de l'ultra-sensibilité aux stimuli dopaminergiques transitoires observée dans le compartiment nucléaire. Ce travail met ainsi en évidence l'existence dans le striatum de mécanismes d'intégration non-linéaires, opposés aux mécanismes de rétrocontrôle souvent rencontrés en biologie, qui tendent à favoriser la détection des événements forts et brefs, en lien avec l'apprentissage par les récompenses.

En résumé, nos travaux soulignent que les propriétés d'intégration si particulières des MSNs résultent d'une régulation fine de la balance kinase/phosphatase, que ce soit par les niveaux d'expression ou la régulation indirecte de ces enzymes, à l'instar de l'inhibition médiée par la protéine DARPP-32 sur l'activité phosphatase. Ce que l'imagerie a permis de mettre en lumière, nous l'avons implanté dans des modèles numériques pour dépasser les limites du modèle expérimental, en réalisant par exemple des stimulations plus physiologiques, impossibles à obtenir autrement, ou encore en simulant des scénarii pouvant

récapituler/reproduire nos observations, et ainsi identifier les déterminants moléculaires des réponses que nous avons mesurées. Il reste à étudier comment ces propriétés s'inscrivent dans des réponses à d'autres neuromodulateurs, qui ont des profils de libération différents de la dopamine. Plus important encore, comment les spécificités d'intégration du signal décrites ici se mettent en place lors de la coïncidence de la libération de dopamine avec une libération de glutamate ou d'acétylcholine par exemple.

Enfin, dans un contexte pathologique, de nombreuses adaptations affectant les MSNs striataux ont été décrites mais leurs conséquences fonctionnelles à l'échelle de la signalisation AMPc/PKA restent encore floues à ce jour. Par exemple dans un modèle parkinsonien, nous avons étudié les adaptations cellulaires mises en place par les neurones D1 et D2 lors d'une déplétion chronique en dopamine. En effet alors que l'hypersensibilité à la dopamine observée dans les neurones D1 est en accord avec une expression plus importante des protéines G_{olf} dans la maladie de Parkinson (Corvol et al., 2004), mon travail démontre pour la première fois que des adaptations homéostatiques surviennent en aval du récepteur, notamment l'augmentation des actions des phosphodiésterases de type 2 et 4. Il serait intéressant de cibler ces PDEs dans une perspective thérapeutique : par exemple, est-ce que l'inhibition de la PDE2 permettrait de limiter les symptômes parkinsoniens ou bien les effets secondaires de la dopathérapie ? est-ce qu'au contraire la prise en charge des effets secondaires de la dopathérapie nécessiterait plutôt l'activation de la PDE2 ? Des questions qui pourraient être étudiées, d'autant plus que l'on dispose à présent d'inhibiteurs spécifiques de la PDE2, capables de pénétrer dans le cerveau après administration orale (Redrobe et al., 2014, 2015; Prickaerts et al., 2017), mais actuellement testés en clinique pour le traitement de la schizophrénie et troubles cognitifs associés.

Bibliographie

- AHN, J. H., MCAVOY, T., RAKHILIN, S. V., NISHI, A., GREENGARD, P. & NAIRN, A. C. 2007. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2979-84.
- ALBERT, P. R., NEVE, K. A., BUNZOW, J. R. & CIVELLI, O. 1990. Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. *J Biol Chem*, 265, 2098-104.
- ALBIN, R. L., YOUNG, A. B. & PENNEY, J. B. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12, 366-75.
- ALCACER, C., SANTINI, E., VALJENT, E., GAVEN, F., GIRAULT, J. A. & HERVÉ, D. 2012. Ga(olf) mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *J Neurosci*, 32, 5900-10.
- ALLEN, M. D. & ZHANG, J. 2006. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 716-21.
- ANTONI, F. A., PALKOVITS, M., SIMPSON, J., SMITH, S. M., LEITCH, A. L., ROSIE, R., FINK, G. & PATERSON, J. M. 1998. Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *J Neurosci*, 18, 9650-61.
- ARBUTHNOTT, G. W. & WICKENS, J. 2007. Space, time and dopamine. *Trends Neurosci*, 30, 62-9.
- ARIANO, M. A., LEWICKI, J. A., BRANDWEIN, H. J. & MURAD, F. 1982. Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 1316-20.
- ARIANO, M. A., WANG, J., NOBLETT, K. L., LARSON, E. R. & SIBLEY, D. R. 1997. Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res*, 752, 26-34.
- ARNSTEN, A. F., RAMOS, B. P., BIRNBAUM, S. G. & TAYLOR, J. R. 2005. Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges. *Trends Mol Med*, 11, 121-8.
- AUGUSTIN, S. M., BEELER, J. A., MCGEHEE, D. S. & ZHUANG, X. 2014. Cyclic AMP and afferent activity govern bidirectional synaptic plasticity in striatopallidal neurons. *J Neurosci*, 34, 6692-9.
- AVERAIMO, S. & NICOL, X. 2014. Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Front Cell Neurosci*, 8, 376.

- B.J., F. K. & GEORGE, P. (eds.) 2007. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3rd edition: Academic Press.
- BAILLIE, G. S., MACKENZIE, S. J., MCPHEE, I. & HOUSLAY, M. D. 2000. Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol*, 131, 811-9.
- BALLARÍN, M., FREDHOLM, B. B., AMBROSIO, S. & MAHY, N. 1991. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand*, 142, 97-103.
- BATEUP, H. S., SANTINI, E., SHEN, W., BIRNBAUM, S., VALJENT, E., SURMEIER, D. J., FISONE, G., NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. 2010. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14845-50.
- BATEUP, H. S., SVENNINGSSON, P., KUROIWA, M., GONG, S., NISHI, A., HEINTZ, N. & GREENGARD, P. 2008. Cell-type specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nature Neuroscience*, 11, 932-939.
- BAXTER, M. G. 2003. Age-related memory impairment. Is the cure worse than the disease? *Neuron*, 40, 669-70.
- BAYER, H. M., LAU, B. & GLIMCHER, P. W. 2007. Statistics of midbrain dopamine neuron spike trains in the awake primate. *J Neurophysiol*, 98, 1428-39.
- BEARD, M. B., OLSEN, A. E., JONES, R. E., ERDOGAN, S., HOUSLAY, M. D. & BOLGER, G. B. 2000. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem*, 275, 10349-58.
- BEAULIEU, J.-M. & GAINETDINOV, R. R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63, 182-217.
- BEAULIEU, J. M., ESPINOZA, S. & GAINETDINOV, R. R. 2015. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*, 172, 1-23.
- BEAULIEU, J. M., SOTNIKOVA, T. D., MARION, S., LEFKOWITZ, R. J., GAINETDINOV, R. R. & CARON, M. G. 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, 122, 261-73.
- BEAVO, J. A. & BRUNTON, L. L. 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 710-8.
- BEEBE, S. J., SALOMONSKY, P., JAHNSEN, T. & LI, Y. 1992. The C gamma subunit is a unique isozyme of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 267, 25505-12.
- BENDER, A. T. & BEAVO, J. A. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*, 58, 488-520.

- BERKE, J. D., PALETZKI, R. F., ARONSON, G. J., HYMAN, S. E. & GERFEN, C. R. 1998. A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci*, 18, 5301-10.
- BERTRAN-GONZALEZ, J., BOSCH, C., MAROTEAUX, M., MATAMALES, M., HERVÉ, D., VALJENT, E. & GIRAULT, J. A. 2008. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*, 28, 5671-85.
- BIBB, J. A., SNYDER, G. L., NISHI, A., YAN, Z., MEIJER, L., FIENBERG, A. A., TSAI, L. H., KWON, Y. T., GIRAULT, J. A., CZERNIK, A. J., HUGANIR, R. L., HEMMINGS, H. C., JR., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 1999. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, 402, 669-71.
- BISHOP, G. A., CHANG, H. T. & KITAI, S. T. 1982. Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience*, 7, 179-91.
- BJORKLUND, A. & DUNNETT, S. B. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neuroscience*, 30, 194-202.
- BLANDINI, F., ARMENTERO, M. T. & MARTIGNONI, E. 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat Disord*, 14 Suppl 2, S124-9.
- BLOKLAND, A., SCHREIBER, R. & PRICKAERTS, J. 2006. Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr Pharm Des*, 12, 2511-23.
- BLUM, D., TORCH, S., LAMBENG, N., NISSOU, M., BENABID, A. L., SADOUL, R. & VERNA, J. M. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 65, 135-72.
- BOESS, F. G., HENDRIX, M., VAN DER STAAY, F. J., ERB, C., SCHREIBER, R., VAN STAVEREN, W., DE VENTE, J., PRICKAERTS, J., BLOKLAND, A. & KOENIG, G. 2004. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology*, 47, 1081-92.
- BOLAM, J. P., HANLEY, J. J., BOOTH, P. A. & BEVAN, M. D. 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat*, 196 (Pt 4), 527-42.
- BOLGER, G., MICHAELI, T., MARTINS, T., ST JOHN, T., STEINER, B., RODGERS, L., RIGGS, M., WIGLER, M. & FERGUSON, K. 1993. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol*, 13, 6558-71.
- BOLGER, G. B., BAILLIE, G. S., LI, X., LYNCH, M. J., HERZYK, P., MOHAMED, A., MITCHELL, L. H., MCCAHERN, A., HUNDSRUCKER, C., KLUSSMANN, E., ADAMS, D. R. & HOUSLAY, M. D. 2006. Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling

- scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Biochem J*, 398, 23-36.
- BONAVENTURA, J., NAVARRO, G., CASADÓ-ANGUERA, V., AZDAD, K., REA, W., MORENO, E., BRUGAROLAS, M., MALLOL, J., CANELA, E. I., LLUÍS, C., CORTÉS, A., VOLKOW, N. D., SCHIFFMANN, S. N., FERRÉ, S. & CASADÓ, V. 2015. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E3609-18.
- BORDET, R. 2004. [Central dopaminergic receptors (Part II): pathophysiological and therapeutic considerations]. *Rev Neurol (Paris)*, 160, 986-92.
- BRANDON, E. P., LOGUE, S. F., ADAMS, M. R., QI, M., SULLIVAN, S. P., MATSUMOTO, A. M., DORSA, D. M., WEHNER, J. M., MCKNIGHT, G. S. & IDZERDA, R. L. 1998. Defective motor behavior and neural gene expression in RIIbeta-protein kinase A mutant mice. *J Neurosci*, 18, 3639-49.
- BROMBERG-MARTIN, E. S., MATSUMOTO, M. & HIKOSAKA, O. 2010. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68, 815-34.
- BRUST, T. F., HAYES, M. P., ROMAN, D. L., BURRIS, K. D. & WATTS, V. J. 2015. Bias analyses of preclinical and clinical D2 dopamine ligands: studies with immediate and complex signaling pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 352, 480-93.
- BURGIN, A. B., MAGNUSSON, O. T., SINGH, J., WITTE, P., STAKER, B. L., BJORNSSON, J. M., THORSTEINSDOTTIR, M., HRAFNSDOTTIR, S., HAGEN, T., KISELYOV, A. S., STEWART, L. J. & GURNEY, M. E. 2010. Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol*, 28, 63-70.
- BURTON, A. C., NAKAMURA, K. & ROESCH, M. R. 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol Learn Mem*, 117, 51-9.
- CADD, G. & MCKNIGHT, G. S. 1989. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron*, 3, 71-79.
- CAILLÉ, I., DUMARTIN, B. & BLOCH, B. 1996. Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res*, 730, 17-31.
- CALABRESI, P., DI FILIPPO, M., GHIGLIERI, V. & PICCONI, B. 2008. Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord*, 23 Suppl 3, S570-9.
- CALABRESI, P., PICCONI, B., TOZZI, A. & DI FILIPPO, M. 2007. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 30, 211-9.

- CALABRESI, P., PICCONI, B., TOZZI, A., GHIGLIERI, V. & DI FILIPPO, M. 2014. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, 17, 1022-30.
- CALEBIRO, D. & MAIELLARO, I. 2014. cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Front Cell Neurosci*, 8, 350.
- CANALS, M., MARCELLINO, D., FANELLI, F., CIRUELA, F., DE BENEDETTI, P., GOLDBERG, S. R., NEVE, K., FUXE, K., AGNATI, L. F., WOODS, A. S., FERRÉ, S., LLUIS, C., BOUVIER, M. & FRANCO, R. 2003. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*, 278, 46741-9.
- CARNEGIE, G. K. & SCOTT, J. D. 2003. A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. *Genes And Development*, 17, 1557-1568.
- CASSANO, S., GALLO, A., BUCCIGROSSI, V., PORCELLINI, A., CERILLO, R., GOTTESMAN, M. E. & AVVEDIMENTO, E. V. 1996. Membrane localization of cAMP-dependent protein kinase amplifies cAMP signaling to the nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem*, 271, 29870-5.
- CASTRO, L., YAPO, C. & VINCENT, P. 2016. [Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons]. *Biol Aujourd'hui*, 210, 191-203.
- CASTRO, L. R., GUIOT, E., POLITO, M., PAUPARDIN-TRITSCH, D. & VINCENT, P. 2014. Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Biotechnol J*, 9, 192-202.
- CASTRO, L. R. V., BRITO, M., GUIOT, E., POLITO, M., KORN, C. W., HERVÉ, D., GIRAULT, J.-A., PAUPARDIN-TRITSCH, D. & VINCENT, P. 2013. Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *The Journal of Physiology*, 591, 3197-3214.
- CASTRO, L. R. V., GERVASI, N., GUIOT, E., CAVELLINI, L., NIKOLAEV, V. O., PAUPARDIN-TRITSCH, D. & VINCENT, P. 2010. Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 30, 6143-6151.
- CECHOVA, S. & VENTON, B. J. 2008. Transient adenosine efflux in the rat caudate-putamen. *J Neurochem*, 105, 1253-63.
- CEROVIC, M., D'ISA, R., TONINI, R. & BRAMBILLA, R. 2013. Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum. *Neurobiol Learn Mem*, 105, 63-80.
- CHAN, C. S., PETERSON, J. D., GERTLER, T. S., GLAJCH, K. E., QUINTANA, R. E., CUI, Q., SEBEL, L. E., PLOTKIN, J. L., SHEN, W., HEIMAN, M., HEINTZ, N., GREENGARD, P. & SURMEIER, D. J. 2012. Strain-specific regulation of striatal phenotype in Drd2-eGFP BAC transgenic mice. *J Neurosci*, 32, 9124-32.

- CHAPPIE, T., HUMPHREY, J., MENNITI, F. & SCHMIDT, C. 2009. PDE10A inhibitors: an assessment of the current CNS drug discovery landscape. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 458-67.
- CHERGUI, K., SUAUD-CHAGNY, M. F. & GONON, F. 1994. Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neuroscience*, 62, 641-5.
- CHERRY, J. A. & DAVIS, R. L. 1999. Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol*, 407, 287-301.
- CHEVALIER, G. & DENIAU, J. M. 1990. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci*, 13, 277-80.
- CHRISTENSON, J. G., DAIRMAN, W. & UDENFRIEND, S. 1970. Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch Biochem Biophys*, 141, 356-67.
- CHRISTIE, M., CHANG, C. W., RÓNA, G., SMITH, K. M., STEWART, A. G., TAKEDA, A. A., FONTES, M. R., STEWART, M., VÉRTESSY, B. G., FORWOOD, J. K. & KOBE, B. 2016. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J Mol Biol*, 428, 2060-90.
- COHEN, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*, 58, 453-508.
- COHEN, S. & GREENBERG, M. E. 2008. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24, 183-209.
- COLE, D. G., KOBIERSKI, L. A., KONRADI, C. & HYMAN, S. E. 1994. 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9631-5.
- CORVOL, J.-C., MURIEL, M.-P., VALJENT, E., FEGER, J., HANOUN, N., GIRAULT, J.-A., HIRSCH, E. C. & HERVE, D. 2004. Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *The Journal of Neuroscience*, 24, 7007-7014.
- CORVOL, J. C., STUDLER, J. M., SCHONN, J. S., GIRAULT, J. A. & HERVÉ, D. 2001. Gaolf is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 76, 1585-1588.
- CRAVEN, K. B. & ZAGOTTA, W. N. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*, 68, 375-401.
- CUI, G., JUN, S. B., JIN, X., PHAM, M. D., VOGEL, S. S., LOVINGER, D. M. & COSTA, R. M. 2013. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*, 494, 238-42.
- CUMMING, P. 2011. Absolute abundances and affinity states of dopamine receptors in mammalian brain: A review. *Synapse*, 65, 892-909.

- DA CRUZ E SILVA, E. F., FOX, C. A., OUMET, C. C., GUSTAFSON, E., WATSON, S. J. & GREENGARD, P. 1995. Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J Neurosci*, 15, 3375-89.
- DAY, M., WANG, Z., DING, J., AN, X., INGHAM, C. A., SHERING, A. F., WOKOSIN, D., ILIJIC, E., SUN, Z., SAMPSON, A. R., MUGNAINI, E., DEUTCH, A. Y., SESACK, S. R., ARBUTHNOTT, G. W. & SURMEIER, D. J. 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci*, 9, 251-9.
- DAY, M., WOKOSIN, D., PLOTKIN, J. L., TIAN, X. & SURMEIER, D. J. 2008. Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci*, 28, 11603-14.
- DEL'GUIDICE, T., LEMASSON, M. & BEAULIEU, J. M. 2011. Role of Beta-arrestin 2 downstream of dopamine receptors in the Basal Ganglia. *Front Neuroanat*, 5, 58.
- DELONG, M. R. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, 13, 281-5.
- DEPRY, C., ALLEN, M. D. & ZHANG, J. 2011. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst*, 7, 52-8.
- DESCARRIES, L., WATKINS, K. C., GARCIA, S., BOSLER, O. & DOUCET, G. 1996. Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol*, 375, 167-86.
- DESDOITS, F., CHEETHAM, J. J., HUANG, H. B., KWON, Y. G., DA CRUZ E SILVA, E. F., DENEFLÉ, P., EHRLICH, M. E., NAIRN, A. C., GREENGARD, P. & GIRAULT, J. A. 1995a. Mechanism of inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32: studies with recombinant DARPP-32 and synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 652-8.
- DESDOITS, F., SICILIANO, J. C., GREENGARD, P. & GIRAULT, J. A. 1995b. Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 2682-5.
- DIANA, M., GARCIA-MUNOZ, M., RICHARDS, J. & FREED, C. R. 1989. Electrophysiological analysis of dopamine cells from the substantia nigra pars compacta of circling rats. *Exp Brain Res*, 74, 625-30.
- DIFIGLIA, M., PASIK, T. & PASIK, P. 1979. Developmental aspects of neostriatal organization in monkeys. *Appl Neurophysiol*, 42, 81-3.
- DIFRANCESCO, J. C. & DIFRANCESCO, D. 2015. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci*, 6, 174.
- DING, J. D., BURETTE, A., NEDVETSKY, P. I., SCHMIDT, H. H. & WEINBERG, R. J. 2004. Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol*, 472, 437-48.

- DIPILATO, L. M., CHENG, X. & ZHANG, J. 2004. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 16513-16518.
- DODGE, K. L., KHOUANGSATHIENE, S., KAPILOFF, M. S., MOUTON, R., HILL, E. V., HOUSLAY, M. D., LANGEBOER, L. K. & SCOTT, J. D. 2001. mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J*, 20, 1921-30.
- DODGE-KAFKA, K. L. & KAPILOFF, M. S. 2006. The mAKAP signaling complex: integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *Eur J Cell Biol*, 85, 593-602.
- DOUCET, G., DESCARRIES, L. & GARCIA, S. 1986. Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience*, 19, 427-45.
- DREYER, J. K., HERRIK, K. F., BERG, R. W. & HOUNSGAARD, J. D. 2010. Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci*, 30, 14273-83.
- DRINNAN, S. L., HOPE, B. T., SNUTCH, T. P. & VINCENT, S. R. 1991. G-oIf in the basal ganglia. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 2, 66-70.
- DUMARTIN, B., JABER, M., GONON, F., CARON, M. G., GIROS, B. & BLOCH, B. 2000. Dopamine tone regulates D1 receptor trafficking and delivery in striatal neurons in dopamine transporter-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1879-84.
- EHRENGRUBER, M. U., LUNDSTROM, K., SCHWEITZER, C., HEUSS, C., SCHLESINGER, S. & GÄHWILER, B. H. 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7041-6.
- EHRMAN, L. A., WILLIAMS, M. T., SCHAEFER, T. L., GUDELSKY, G. A., REED, T. M., FIENBERG, A. A., GREENGARD, P. & VORHEES, C. V. 2006. Phosphodiesterase 1B differentially modulates the effects of methamphetamine on locomotor activity and spatial learning through DARPP32-dependent pathways: evidence from PDE1B-DARPP32 double-knockout mice. *Genes Brain Behav*, 5, 540-51.
- ENA, S., DE KERCHOVE D'EXAERDE, A. & SCHIFFMANN, S. N. 2011. Unraveling the differential functions and regulation of striatal neuron sub-populations in motor control, reward, and motivational processes. *Front Behav Neurosci*, 5, 47.
- ENJALBERT, A. & BOCKAERT, J. 1983. Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol*, 23, 576-84.
- FELICIELLO, A., LI, Y., AVVEDIMENTO, E. V., GOTTESMAN, M. E. & RUBIN, C. S. 1997. A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signaling to the nucleus. *Current Biology*, 7, 1011-1014.

- FERNANDEZ, E., SCHIAPPA, R., GIRAULT, J. A. & LE NOVERE, N. 2006. DARPP-32 is a robust integrator of dopamine and glutamate signals. *PLoS Comput Biol*, 2, e176.
- FERRE, S., VON EULER, G., JOHANSSON, B., FREDHOLM, B. B. & FUXE, K. 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7238-41.
- FERRÉ, S., FREDHOLM, B. B., MORELLI, M., POPOLI, P. & FUXE, K. 1997. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 20, 482-7.
- FERRÉ, S., QUIROZ, C., WOODS, A. S., CUNHA, R., POPOLI, P., CIRUELA, F., LLUIS, C., FRANCO, R., AZDAD, K. & SCHIFFMANN, S. N. 2008. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des*, 14, 1468-74.
- FIDOCK, M., MILLER, M. & LANFEAR, J. 2002. Isolation and differential tissue distribution of two human cDNAs encoding PDE1 splice variants. *Cell Signal*, 14, 53-60.
- FIEBLINGER, T., GRAVES, S. M., SEBEL, L. E., ALCACER, C., PLOTKIN, J. L., GERTLER, T. S., CHAN, C. S., HEIMAN, M., GREENGARD, P., CENCI, M. A. & SURMEIER, D. J. 2014. Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Commun*, 5, 5316.
- FIENBERG, A. A., HIROI, N., MERMELSTEIN, P. G., SONG, W., SNYDER, G. L., NISHI, A., CHERAMY, A., O'CALLAGHAN, J. P., MILLER, D. B., COLE, D. G., CORBETT, R., HAILE, C. N., COOPER, D. C., ONN, S. P., GRACE, A. A., OUMET, C. C., WHITE, F. J., HYMAN, S. E., SURMEIER, D. J., GIRAULT, J., NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. 1998. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, 281, 838-42.
- FISHER, D. A., SMITH, J. F., PILLAR, J. S., ST DENIS, S. H. & CHENG, J. B. 1998. Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *J Biol Chem*, 273, 15559-64.
- FLORESCO, S. B., WEST, A. R., ASH, B., MOORE, H. & GRACE, A. A. 2003. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, 6, 968-973.
- FORD, C. P. 2014. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience*, 282, 13-22.
- FRANCARDO, V., RECCHIA, A., POPOVIC, N., ANDERSSON, D., NISSBRANDT, H. & CENCI, M. A. 2011. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 42, 327-40.

- FREEZE, B. S., KRAVITZ, A. V., HAMMACK, N., BERKE, J. D. & KREITZER, A. C. 2013. Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci*, 33, 18531-9.
- FREUND, T. F., POWELL, J. F. & SMITH, A. D. 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, 13, 1189-215.
- FRIEDRICH, M. W., ARAMUNI, G., MANK, M., MACKINNON, J. A. G. & GRIESBECK, O. 2010. Imaging CREB activation in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 23285-23295.
- FUJISHIGE, K., KOTERA, J. & OMORI, K. 1999. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem*, 266, 1118-27.
- FUJISHIGE, K., KOTERA, J., YUASA, K. & OMORI, K. 2000. The human phosphodiesterase PDE10A gene genomic organization and evolutionary relatedness with other PDEs containing GAF domains. *Eur J Biochem*, 267, 5943-51.
- FUXE, K., AGNATI, L. F., JACOBSEN, K., HILLION, J., CANALS, M., TORVINEN, M., TINNER-STAINES, B., STAINES, W., ROSIN, D., TERASMAA, A., POPOLI, P., LEO, G., VERGONI, V., LLUIS, C., CIRUELA, F., FRANCO, R. & FERRÉ, S. 2003. Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology*, 61, S19-23.
- FUXE, K., DAHLSTRÖM, A. B., JONSSON, G., MARCELLINO, D., GUESCINI, M., DAM, M., MANGER, P. & AGNATI, L. 2010. The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. *Prog Neurobiol*, 90, 82-100.
- GAGNON, D., PETRYSZYN, S., SANCHEZ, M. G., BORIES, C., BEAULIEU, J. M., DE KONINCK, Y., PARENT, A. & PARENT, M. 2017. Striatal Neurons Expressing D. *Sci Rep*, 7, 41432.
- GAMANUMA, M., YUASA, K., SASAKI, T., SAKURAI, N., KOTERA, J. & OMORI, K. 2003. Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans. *Cell Signal*, 15, 565-74.
- GANDELMAN, K. Y., HARMON, S., TODD, R. D. & O'MALLEY, K. L. 1991. Analysis of the structure and expression of the human dopamine D2A receptor gene. *J Neurochem*, 56, 1024-9.
- GARDNER, B., LIU, Z. F., JIANG, D. & SIBLEY, D. R. 2001. The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation. *Mol Pharmacol*, 59, 310-21.

- GARVER, D. L., JOHNSON, C. & KANTER, D. R. 1982. Schizophrenia and reduced cyclic AMP production: evidence for the role of receptor-linked events. *Life Sci*, 31, 1987-92.
- GEOFFROY, V., FOUQUE, F., NIVET, V., CLOT, J. P., LUGNIER, C., DESBUQUOIS, B. & BENELLI, C. 1999. Activation of a cGMP-stimulated cAMP phosphodiesterase by protein kinase C in a liver Golgi-endosomal fraction. *Eur J Biochem*, 259, 892-900.
- GERFEN, C. R. 1989. The neostriatal mosaic: striatal patch-matrix organization is related to cortical lamination. *Science*, 246, 385-8.
- GERFEN, C. R. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci*, 15, 133-9.
- GERFEN, C. R., BAIMBRIDGE, K. G. & MILLER, J. J. 1985. The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8780-4.
- GERFEN, C. R., BAIMBRIDGE, K. G. & THIBAUT, J. 1987a. The neostriatal mosaic: III. Biochemical and developmental dissociation of patch-matrix mesostriatal systems. *J Neurosci*, 7, 3935-44.
- GERFEN, C. R., ENGBER, T. M., MAHAN, L. C., SUSEL, Z., CHASE, T. N., MONSMA, F. J. & SIBLEY, D. R. 1990a. D1 AND D2 DOPAMINE RECEPTOR REGULATED GENE-EXPRESSION OF STRIATONIGRAL AND STRIATOPALLIDAL NEURONS. *Science*, 250, 1429-1432.
- GERFEN, C. R., ENGBER, T. M., MAHAN, L. C., SUSEL, Z., CHASE, T. N., MONSMA, F. J. & SIBLEY, D. R. 1990b. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250, 1429-32.
- GERFEN, C. R., HERKENHAM, M. & THIBAUT, J. 1987b. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci*, 7, 3915-34.
- GERFEN, C. R., MIYACHI, S., PALETZKI, R. & BROWN, P. 2002. D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *J Neurosci*, 22, 5042-54.
- GERFEN, C. R. & SURMEIER, D. J. 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*, 34, 441-66.
- GERFEN, C. R. & YOUNG, W. S. 1988. Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res*, 460, 161-7.
- GERTLER, T. S., CHAN, C. S. & SURMEIER, D. J. 2008. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci*, 28, 10814-24.
- GERVASI, N., HEPP, R., TRICOIRE, L., ZHANG, J., LAMBOLEZ, B., PAUPARDIN-TRITSCH, D. & VINCENT, P. 2007. Dynamics of protein

- kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *The Journal of Neuroscience*, 27, 2744-2750.
- GERVASI, N., TCHÉNIO, P. & PREAT, T. 2010. PKA dynamics in a Drosophila learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron*, 65, 516-29.
- GIAMPA, C., LAURENTI, D., ANZILOTTI, S., BERNARDI, G., MENNITI, F. S. & FUSCO, F. R. 2010. Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, 5, e13417.
- GINÉS, S., HILLION, J., TORVINEN, M., LE CROM, S., CASADÓ, V., CANELA, E. I., RONDIN, S., LEW, J. Y., WATSON, S., ZOLI, M., AGNATI, L. F., VERNIERA, P., LLUIS, C., FERRÉ, S., FUXE, K. & FRANCO, R. 2000. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8606-11.
- GIORGI, M., D'ANGELO, V., ESPOSITO, Z., NUCCETELLI, V., SORGE, R., MARTORANA, A., STEFANI, A., BERNARDI, G. & SANCESARIO, G. 2008. Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *Eur J Neurosci*, 28, 941-50.
- GIORGI, M., MELCHIORRI, G., NUCCETELLI, V., D'ANGELO, V., MARTORANA, A., SORGE, R., CASTELLI, V., BERNARDI, G. & SANCESARIO, G. 2011. PDE10A and PDE10A-dependent cAMP catabolism are dysregulated oppositely in striatum and nucleus accumbens after lesion of midbrain dopamine neurons in rat: a key step in parkinsonism physiopathology. *Neurobiol Dis*, 43, 293-303.
- GIRAULT, J. A. 2012. Signaling in striatal neurons: the phosphoproteins of reward, addiction, and dyskinesia. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 106, 33-62.
- GIRAULT, J. A., HEMMINGS, H. C., JR., WILLIAMS, K. R., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 1989. Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. *J Biol Chem*, 264, 21748-59.
- GIROS, B., JABER, M., JONES, S. R., WIGHTMAN, R. M. & CARON, M. G. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 379, 606-12.
- GLOERICH, M. & BOS, J. L. 2010. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 355-75.
- GODINHO, R. O., DUARTE, T. & PACINI, E. S. 2015. New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. *Front Pharmacol*, 6, 58.
- GONON, F., BURIE, J. B., JABER, M., BENOIT-MARAND, M., DUMARTIN, B. & BLOCH, B. 2000. Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in

- the rat striatum and in mice lacking the dopamine transporter. *Prog Brain Res*, 125, 291-302.
- GONON, F. G. 1988. Non linear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by in vivo electrochemistry. *Neuroscience*, 24, 19-28.
- GONON, F. G. 1997. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 17, 5972-5978.
- GONZALES, C. & CHESSELET, M. F. 1990. Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol*, 297, 182-200.
- GORSHKOV, K., MEHTA, S., RAMAMURTHY, S., RONNETT, G. V., ZHOU, F. Q. & ZHANG, J. 2017. AKAP-mediated feedback control of cAMP gradients in developing hippocampal neurons. *Nat Chem Biol*, 13, 425-431.
- GOTO, Y., OTANI, S. & GRACE, A. A. 2007. The yin and yang of dopamine release: a new perspective. *Neuropharmacology* 53, 53, 583-587.
- GRACE, A. A. & BUNNEY, B. S. 1984a. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci*, 4, 2877-90.
- GRACE, A. A. & BUNNEY, B. S. 1984b. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*, 4, 2866-76.
- GRAUER, S. M., PULITO, V. L., NAVARRA, R. L., KELLY, M. P., KELLEY, C., GRAF, R., LANGEN, B., LOGUE, S., BRENNAN, J., JIANG, L., CHARYCH, E., EGERLAND, U., LIU, F., MARQUIS, K. L., MALAMAS, M., HAGE, T., COMERY, T. A. & BRANDON, N. J. 2009. Phosphodiesterase 10A inhibitor activity in preclinical models of the positive, cognitive, and negative symptoms of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*, 331, 574-90.
- GRAYBIEL, A. M. 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci*, 31, 359-87.
- GRAYBIEL, A. M., MORATALLA, R. & ROBERTSON, H. A. 1990. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6912-6.
- GRAYBIEL, A. M. & RAGSDALE, C. W. 1978. Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5723-6.
- GREENGARD, P. 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science*, 294, 1024-30.
- GREENGARD, P., ALLEN, P. B. & NAIRN, A. C. 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, 23, 435-47.

- GRILLNER, S., HELLGREN, J., MÉNARD, A., SAITOH, K. & WIKSTRÖM, M. A. 2005. Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci*, 28, 364-70.
- GROFOVÁ, I. 1975. The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 91, 286-91.
- HABER, S. N., RYOO, H., COX, C. & LU, W. 1995. Subsets of midbrain dopaminergic neurons in monkeys are distinguished by different levels of mRNA for the dopamine transporter: comparison with the mRNA for the D2 receptor, tyrosine hydroxylase and calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 362, 400-10.
- HAGIWARA, M., BRINDLE, P., HAROOTUNIAN, A., ARMSTRONG, R., RIVIER, J., VALE, W., TSIEN, R. & MONTMINY, M. R. 1993. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol*, 13, 4852-9.
- HAI SLIMANE, Z., BEDIOUNE, I., LECHÊNE, P., VARIN, A., LEFEBVRE, F., MATEO, P., DOMERGUE-DUPONT, V., DEWENTER, M., RICHTER, W., CONTI, M., EL-ARMOUCHE, A., ZHANG, J., FISCHMEISTER, R. & VANDECASTEELE, G. 2014. Control of cytoplasmic and nuclear protein kinase A by phosphodiesterases and phosphatases in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*, 102, 97-106.
- HANOUNE, J. & DEFER, N. 2001. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, 41, 145-174.
- HAROOTUNIAN, A. T., ADAMS, S. R., WEN, W., MEINKOTH, J. L., TAYLOR, S. S. & TSIEN, R. Y. 1993. Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Molecular Biology of the Cell*, 4, 993-1002.
- HART, A. S., RUTLEDGE, R. B., GLIMCHER, P. W. & PHILLIPS, P. E. 2014. Phasic dopamine release in the rat nucleus accumbens symmetrically encodes a reward prediction error term. *J Neurosci*, 34, 698-704.
- HATZELMANN, A., MORCILLO, E. J., LUNGARELLA, G., ADNOT, S., SANJAR, S., BEUME, R., SCHUDT, C. & TENOR, H. 2010. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*, 23, 235-56.
- HAUBER, W. 2010. Dopamine release in the prefrontal cortex and striatum: temporal and behavioural aspects. *Pharmacopsychiatry*, 43 Suppl 1, S32-41.
- HAYASHI, M., SHIMADA, Y., NISHIMURA, Y., HAMA, T. & TANAKA, T. 2002. Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 297, 1253-8.

- HEBB, A. L., ROBERTSON, H. A. & DENOVA-WRIGHT, E. M. 2004. Striatal phosphodiesterase mRNA and protein levels are reduced in Huntington's disease transgenic mice prior to the onset of motor symptoms. *Neuroscience*, 123, 967-81.
- HEIEN, M. L., KHAN, A. S., ARIANSEN, J. L., CHEER, J. F., PHILLIPS, P. E., WASSUM, K. M. & WIGHTMAN, R. M. 2005. Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10023-8.
- HEIKAUS, C. C., PANDIT, J. & KLEVIT, R. E. 2009. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure*, 17, 1551-1557.
- HEIMAN, M., HEILBUT, A., FRANCARDO, V., KULICKE, R., FENSTER, R. J., KOLACZYK, E. D., MESIROV, J. P., SURMEIER, D. J., CENCI, M. A. & GREENGARD, P. 2014. Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4578-83.
- HEINEKE, J. & RITTER, O. 2012. Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 62-73.
- HEMMINGS, H. C., GREENGARD, P., TUNG, H. Y. & COHEN, P. 1984. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, 310, 503-5.
- HERKENHAM, M. & NAUTA, W. J. 1979. Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 187, 19-47.
- HERKENHAM, M. & PERT, C. B. 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291, 415-8.
- HERMAN, J. P., DOLGAS, C. M., RUCKER, D. & LANGUB, M. C. 1996. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol*, 369, 165-87.
- HERRMANN, S., SCHNORR, S. & LUDWIG, A. 2015. HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci*, 16, 1429-47.
- HERSCH, S. M., CILIAUX, B. J., GUTEKUNST, C. A., REES, H. D., HEILMAN, C. J., YUNG, K. K., BOLAM, J. P., INCE, E., YI, H. & LEVEY, A. I. 1995. Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci*, 15, 5222-37.
- HERVÉ, D., LÉVI-STRAUSS, M., MAREY-SEMPER, I., VERNEY, C., TASSIN, J. P., GLOWINSKI, J. & GIRAULT, J. A. 1993. G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci*, 13, 2237-48.

- HERZIG, S. & NEUMANN, J. 2000. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*, 80, 173-210.
- HORNYKIEWICZ, O. 2001. Chemical neuroanatomy of the basal ganglia - normal and in Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22, 3-12.
- HORNYKIEWICZ, O. 2017. L-DOPA. *J Parkinsons Dis*, 7, S3-S10.
- HORNYKIEWICZ, O. & KISH, S. J. 1987. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*, 45, 19-34.
- HOUSLAY, M. D., BAILLIE, G. S. & MAURICE, D. H. 2007. cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res*, 100, 950-66.
- HOWE, M. W. & DOMBECK, D. A. 2016. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. *Nature*, 535, 505-10.
- HOWE, M. W., TIERNEY, P. L., SANDBERG, S. G., PHILLIPS, P. E. & GRAYBIEL, A. M. 2013. Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards. *Nature*, 500, 575-9.
- HOWES, O. D., KAMBEITZ, J., KIM, E., STAHL, D., SLIFSTEIN, M., ABI-DARGHAM, A. & KAPUR, S. 2012. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of General Psychiatry*, 69, 776-786.
- HU, E., DEMMOU, L., CAULI, B., GALLOPIN, T., GEOFFROY, H., HARRIS-WARRICK, R. M., PAUPARDIN-TRITSCH, D., LAMBOLEZ, B., VINCENT, P. & HEPP, R. 2011. VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb Cortex*, 21, 708-18.
- HUTSON, P. H., FINGER, E. N., MAGLIARO, B. C., SMITH, S. M., CONVERSO, A., SANDERSON, P. E., MULLINS, D., HYDE, L. A., ESCHLE, B. K., TURNBULL, Z., SLOAN, H., GUZZI, M., ZHANG, X., WANG, A., RINDGEN, D., MAZZOLA, R., VIVIAN, J. A., EDDINS, D., USLANER, J. M., BEDNAR, R., GAMBONE, C., LE-MAIR, W., MARINO, M. J., SACHS, N., XU, G. & PARMENTIER-BATTEUR, S. 2011. The selective phosphodiesterase 9 (PDE9) inhibitor PF-04447943 (6-[(3S,4S)-4-methyl-1-(pyrimidin-2-ylmethyl)pyrrolidin-3-yl]-1-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one) enhances synaptic plasticity and cognitive function in rodents. *Neuropharmacology*, 61, 665-76.
- HYMAN, S. E., MALENKA, R. C. & NESTLER, E. J. 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 565-98.
- HÅKANSSON, K., GALDI, S., HENDRICK, J., SNYDER, G., GREENGARD, P. & FISONE, G. 2006. Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors. *J Neurochem*, 96, 482-8.

- I, L. A., M, H. S., B, R. D., K, S. R., B, N. H., A, K. C., L, P. D., MAGGIO, R., R, B. M. & J, C. B. 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 8861-8865.
- ILOUZ, R., LEV-RAM, V., BUSHONG, E. A., STILES, T. L., FRIEDMANN-MORVINSKI, D., DOUGLAS, C., GOLDBERG, J. L., ELLISMAN, M. H. & TAYLOR, S. S. 2017. Isoform-specific subcellular localization and function of protein kinase A identified by mosaic imaging of mouse brain. *Elife*, 6.
- ITO, K., HAGA, T., LAMEH, J. & SADEE, W. 1999. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem*, 260, 112-9.
- JANSSEN, M. J., ADE, K. K., FU, Z. & VICINI, S. 2009. Dopamine modulation of GABA tonic conductance in striatal output neurons. *J Neurosci*, 29, 5116-26.
- JÄGER, R., RUSSWURM, C., SCHWEDE, F., GENIESER, H. G., KOESLING, D. & RUSSWURM, M. 2012. Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 287, 1210-9.
- KAUPP, U. B. & SEIFERT, R. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 82, 769-824.
- KAWAGUCHI, Y., WILSON, C. J., AUGOOD, S. J. & EMSON, P. C. 1995a. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18, 527-35.
- KAWAGUCHI, Y., WILSON, C. J., AUGOOD, S. J. & EMSON, P. C. 1995b. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18, 527-35.
- KEEFE, K. A., ZIGMOND, M. J. & ABERCROMBIE, E. D. 1993. In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J Neural Transm Gen Sect*, 91, 223-40.
- KEHLER, J. & NIELSEN, J. 2011. PDE10A inhibitors: novel therapeutic drugs for schizophrenia. *Curr Pharm Des*, 17, 137-50.
- KELLY, M. P. 2018. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell Signal*, 42, 281-291.
- KELLY, M. P., ADAMOWICZ, W., BOVE, S., HARTMAN, A. J., MARIGA, A., PATHAK, G., REINHART, V., ROMEGIALLI, A. & KLEIMAN, R. J. 2014. Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal*, 26, 383-97.
- KEMP, J. M. & POWELL, T. P. 1971a. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 383-401.
- KEMP, J. M. & POWELL, T. P. 1971b. The termination of fibres from the cerebral cortex and thalamus upon dendritic spines in the caudate nucleus: a study with the Golgi method. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 429-39.

- KENAKIN, T. 2013. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. *Br J Pharmacol*, 168, 554-75.
- KERAVIS, T. & LUGNIER, C. 2012. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol*, 165, 1288-305.
- KHARKWAL, G., RADL, D., LEWIS, R. & BORRELLI, E. 2016. Dopamine D2 receptors in striatal output neurons enable the psychomotor effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 11609-11614.
- KHEW-GOODALL, Y., MAYER, R. E., MAURER, F., STONE, S. R. & HEMMINGS, B. A. 1991. Structure and transcriptional regulation of protein phosphatase 2A catalytic subunit genes. *Biochemistry*, 30, 89-97.
- KIM, O. J., GARDNER, B. R., WILLIAMS, D. B., MARINEC, P. S., CABRERA, D. M., PETERS, J. D., MAK, C. C., KIM, K. M. & SIBLEY, D. R. 2004. The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization: evidence for a novel mechanism of arrestin association. *J Biol Chem*, 279, 7999-8010.
- KIMURA, M. 1990. Behaviorally contingent property of movement-related activity of the primate putamen. *J Neurophysiol*, 63, 1277-96.
- KITA, H. & KITAI, S. T. 1988. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res*, 447, 346-52.
- KLEPPISCH, T. 2009. Phosphodiesterases in the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*, 71-92.
- KOBAYASHI, T., GAMANUMA, M., SASAKI, T., YAMASHITA, Y., YUASA, K., KOTERA, J. & OMORI, K. 2003. Molecular comparison of rat cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family: unique expression of PDE8B in rat brain. *Gene*, 319, 21-31.
- KODIMUTHALI, A., JABARIS, S. S. & PAL, M. 2008. Recent advances on phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Chem*, 51, 5471-89.
- KOMATSU, H. 2015. Novel Therapeutic GPCRs for Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci*, 16, 14109-21.
- KOTERA, J., SASAKI, T., KOBAYASHI, T., FUJISHIGE, K., YAMASHITA, Y. & OMORI, K. 2004. Subcellular localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 10A variants, and alteration of the localization by cAMP-dependent protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, 279, 4366-75.
- KOVOOR, A., SEYFFARTH, P., EBERT, J., BARGHSOON, S., CHEN, C. K., SCHWARZ, S., AXELROD, J. D., CHEYETTE, B. N., SIMON, M. I., LESTER, H. A. & SCHWARZ, J. 2005. D2 dopamine receptors colocalize regulator of G-protein signaling 9-2 (RGS9-2) via the RGS9 DEP domain, and

- RGS9 knock-out mice develop dyskinesias associated with dopamine pathways. *J Neurosci*, 25, 2157-65.
- KRAVITZ, A. V., FREEZE, B. S., PARKER, P. R., KAY, K., THWIN, M. T., DEISSEROTH, K. & KREITZER, A. C. 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466, 622-6.
- KRAVITZ, A. V. & KREITZER, A. C. 2012. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology (Bethesda)*, 27, 167-77.
- KREITZER, A. C. 2009. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci*, 32, 127-47.
- KUROIWA, M., SNYDER, G. L., SHUTO, T., FUKUDA, A., YANAGAWA, Y., BENAVIDES, D. R., NAIRN, A. C., BIBB, J. A., GREENGARD, P. & NISHI, A. 2012. Phosphodiesterase 4 inhibition enhances the dopamine D1 receptor/PKA/DARPP-32 signaling cascade in frontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 219, 1065-79.
- LACEY, C. J., BOYES, J., GERLACH, O., CHEN, L., MAGILL, P. J. & BOLAM, J. P. 2005. GABA(B) receptors at glutamatergic synapses in the rat striatum. *Neuroscience*, 136, 1083-95.
- LAKICS, V., KARRAN, E. H. & BOESS, F. G. 2010. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, 59, 367-74.
- LARUELLE, M., D'SOUZA, C. D., BALDWIN, R. M., ABI-DARGHAM, A., KANES, S. J., FINGADO, C. L., SEIBYL, J. P., ZOGHBI, S. S., BOWERS, M. B., JATLOW, P., CHARNEY, D. S. & INNIS, R. B. 1997. Imaging D2 receptor occupancy by endogenous dopamine in humans. *Neuropsychopharmacology*, 17, 162-74.
- LAURENT, A. C., BRECKLER, M., BERTHOUBE, M. & LEZOUALC'H, F. 2012. Role of Epac in brain and heart. *Biochem Soc Trans*, 40, 51-7.
- LE MOINE, C. & BLOCH, B. 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol*, 355, 418-26.
- LEE, S. P., SO, C. H., RASHID, A. J., VARGHESE, G., CHENG, R., LANCA, A. J., O'DOWD, B. F. & GEORGE, S. R. 2004. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*, 279, 35671-8.
- LEVESQUE, D., DIAZ, J., PILON, C., MARTRES, M. P., GIROS, B., SOUIL, E., SCHOTT, D., MORGAT, J. L., SCHWARTZ, J. C. & SOKOLOFF, P. 1992. Identification, characterization, and localization of the dopamine D3 receptor in rat brain using 7-[3H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8155-9.

- LI, L., GERVASI, N. & GIRAULT, J. A. 2015. Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun*, 6, 6319.
- LIM, J., PAHLKE, G. & CONTI, M. 1999. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem*, 274, 19677-85.
- LJUNGBERG, T., APICELLA, P. & SCHULTZ, W. 1992. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol*, 67, 145-63.
- LOVINGER, D. M. 2010. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*, 58, 951-61.
- LUGNIER, C., KERAVALIS, T., LE BEC, A., PAUVERT, O., PROTEAU, S. & ROUSSEAU, E. 1999. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta*, 1472, 431-46.
- LUGNIER, C., MULLER, B., LE BEC, A., BEAUDRY, C. & ROUSSEAU, E. 1993. Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther*, 265, 1142-51.
- LUGNIER, C., SCHOEFFTER, P., LE BEC, A., STROUTHOU, E. & STOCLET, J. C. 1986. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol*, 35, 1743-51.
- MAIA, T. V. & FRANK, M. J. 2011. From reinforcement learning models to psychiatric and neurological disorders. *Nat Neurosci*, 14, 154-62.
- MAIELLARO, I., LOHSE, M. J., KITTEL, R. J. & CALEBIRO, D. 2016. cAMP Signals in Drosophila Motor Neurons Are Confined to Single Synaptic Boutons. *Cell Rep*, 17, 1238-1246.
- MARCOTT, P. F., MAMALIGAS, A. A. & FORD, C. P. 2014. Phasic dopamine release drives rapid activation of striatal D2-receptors. *Neuron*, 84, 164-76.
- MARTIN, B. R., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H., TAYLOR, S. S. & TSIEN, R. Y. 2007. Isoform-specific PKA dynamics revealed by dye-triggered aggregation and DAKAP1 α -mediated localization in living cells. *Chem Biol*, 14, 1031-42.
- MARTINEZ, S. E., BEAVO, J. A. & HOL, W. G. 2002. GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv*, 2, 317-23.
- MASSON, J., SAGNÉ, C., HAMON, M. & EL MESTIKAWY, S. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 51, 439-64.
- MATAMALES, M. & GIRAULT, J. A. 2011. Signaling from the cytoplasm to the nucleus in striatal medium-sized spiny neurons. *Front Neuroanat*, 5, 37.
- MATSUDA, W., FURUTA, T., NAKAMURA, K. C., HIOKI, H., FUJIYAMA, F., ARAI, R. & KANEKO, T. 2009. Single nigrostriatal dopaminergic neurons

- form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*, 29, 444-53.
- MATSUMOTO, M. & HIKOSAKA, O. 2009. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature*, 459, 837-41.
- MATSUOKA, I., SUZUKI, Y., DEFER, N., NAKANISHI, H. & HANOUNE, J. 1997. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 68, 498-506.
- MATTHIESEN, K. & NIELSEN, J. 2009. Binding of cyclic nucleotides to phosphodiesterase 10A and 11A GAF domains does not stimulate catalytic activity. *Biochem J*, 423, 401-9.
- MAXWELL, C. R., KANES, S. J., ABEL, T. & SIEGEL, S. J. 2004. Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications. *Neuroscience*, 129, 101-7.
- MCKNIGHT, G. S. 1991. Cyclic AMP second messenger systems. *Curr Opin Cell Biol*, 3, 213-7.
- MEINKOTH, J. L., JI, Y., TAYLOR, S. S. & FERAMISCO, J. R. 1990. Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9595-9.
- MENNITI, F. S., CHAPPIE, T. A., HUMPHREY, J. M. & SCHMIDT, C. J. 2007. Phosphodiesterase 10A inhibitors: a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs*, 8, 54-9.
- MENNITI, F. S., FARACI, W. S. & SCHMIDT, C. J. 2006. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 660-70.
- MICHAELI, T., BLOOM, T. J., MARTINS, T., LOUGHNEY, K., FERGUSON, K., RIGGS, M., RODGERS, L., BEAVO, J. A. & WIGLER, M. 1993. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 268, 12925-32.
- MIKA, D. & CONTI, M. 2016. PDE4D phosphorylation: A coincidence detector integrating multiple signaling pathways. *Cell Signal*, 28, 719-24.
- MILLAR, J. K., MACKIE, S., CLAPCOTE, S. J., MURDOCH, H., PICKARD, B. S., CHRISTIE, S., MUIR, W. J., BLACKWOOD, D. H., RODER, J. C., HOUSLAY, M. D. & PORTEOUS, D. J. 2007. Disrupted in schizophrenia 1 and phosphodiesterase 4B: towards an understanding of psychiatric illness. *J Physiol*, 584, 401-5.
- MINK, J. W. 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*, 50, 381-425.
- MIRENOWICZ, J. & SCHULTZ, W. 1996. Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, 379, 449-51.

- MIRÓ, X., PÉREZ-TORRES, S., PALACIOS, J. M., PUIGDOMÈNECH, P. & MENGOD, G. 2001. Differential distribution of cAMP-specific phosphodiesterase 7A mRNA in rat brain and peripheral organs. *Synapse*, 40, 201-14.
- MISHRA, K. & PARNAIK, V. K. 1995. Essential role of protein phosphorylation in nuclear transport. *Exp Cell Res*, 216, 124-34.
- MISSALE, C., NASH, S. R., ROBINSON, S. W., JABER, M. & CARON, M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78, 189-225.
- MONS, N. & COOPER, D. M. 1995. Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends Neurosci*, 18, 536-42.
- MONSMA, F. J., JR., MCVITTIE, L. D., GERFEN, C. R., MAHAN, L. C. & SIBLEY, D. R. 1989. Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*, 342, 926-9.
- MOORE, R. Y. & BLOOM, F. E. 1978. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci*, 1, 129-69.
- MOORHEAD, G. B., DE WEVER, V., TEMPLETON, G. & KERK, D. 2009. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J*, 417, 401-9.
- MOSHAROV, E. V., BORGKVIST, A. & SULZER, D. 2015. Presynaptic effects of levodopa and their possible role in dyskinesia. *Mov Disord*, 30, 45-53.
- MOSS, J. & BOLAM, J. P. 2008. A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J Neurosci*, 28, 11221-30.
- MULY, C. 2002. Signal transduction abnormalities in schizophrenia: the cAMP system. *Psychopharmacol Bull*, 36, 92-105.
- MURER, M. G. & MORATALLA, R. 2011. Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Front Neuroanat*, 5, 51.
- NAIR, A. G., GUTIERREZ-ARENAS, O., ERIKSSON, O., VINCENT, P. & HELLGREN KOTALESKI, J. 2015. Sensing Positive versus Negative Reward Signals through Adenylyl Cyclase-Coupled GPCRs in Direct and Indirect Pathway Striatal Medium Spiny Neurons. *J Neurosci*, 35, 14017-30.
- NAMBU, A., TOKUNO, H. & TAKADA, M. 2002. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*, 43, 111-7.
- NELSON, A. B. & KREITZER, A. C. 2014. Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, 37, 117-35.
- NEVE, K. A., SEAMANS, J. K. & TRANTHAM-DAVIDSON, H. 2004. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, 24, 165-205.
- NEVES, S. R. 2012. Modeling of spatially-restricted intracellular signaling. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4, 103-15.

- NEVES, S. R., TSOKAS, P., SARKAR, A., GRACE, E. A., RANGAMANI, P., TAUBENFELD, S. M., ALBERINI, C. M., SCHAFF, J. C., BLITZER, R. D., MORARU, I. I. & IYENGAR, R. 2008. Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell*, 133, 666-80.
- NGUYEN, M. D. & VENTON, B. J. 2015. Fast-scan Cyclic Voltammetry for the Characterization of Rapid Adenosine Release. *Comput Struct Biotechnol J*, 13, 47-54.
- NICOLA, S. M. 2007. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 521-50.
- NICOLA, S. M., SURMEIER, J. & MALENKA, R. C. 2000. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci*, 23, 185-215.
- NIRENBERG, M. J., CHAN, J., LIU, Y., EDWARDS, R. H. & PICKEL, V. M. 1996. Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci*, 16, 4135-45.
- NISENBAUM, E. S., WILSON, C. J., FOEHRING, R. C. & SURMEIER, D. J. 1996. Isolation and characterization of a persistent potassium current in neostriatal neurons. *J Neurophysiol*, 76, 1180-94.
- NISHI, A., BIBB, J. A., SNYDER, G. L., HIGASHI, H., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2000. Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12840-5.
- NISHI, A., KUROIWA, M., MILLER, D. B., O'CALLAGHAN, J. P., BATEUP, H. S., SHUTO, T., SOTOGAKU, N., FUKUDA, T., HEINTZ, N., GREENGARD, P. & SNYDER, G. L. 2008. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *J Neurosci*, 28, 10460-71.
- NISHI, A., WATANABE, Y., HIGASHI, H., TANAKA, M., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2005. Glutamate regulation of DARPP-32 phosphorylation in neostriatal neurons involves activation of multiple signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1199-204.
- NISHINO, N., KITAMURA, N., HASHIMOTO, T. & TANAKA, C. 1993. Transmembrane signalling systems in the brain of patients with Parkinson's disease. *Rev Neurosci*, 4, 213-22.
- NOBLES, M., BENIANS, A. & TINKER, A. 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18706-11.
- NOYAMA, K. & MAEKAWA, S. 2003. Localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 2 in the brain-derived Triton-insoluble low-density fraction (raft). *Neurosci Res*, 45, 141-8.

- OBESO, J. A., RODRÍGUEZ-OROZ, M. C., BENITEZ-TEMINO, B., BLESÁ, F. J., GURIDI, J., MARIN, C. & RODRIGUEZ, M. 2008. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23 Suppl 3, S548-59.
- OLIVER, C. J. & SHENOLIKAR, S. 1998. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci*, 3, D961-72.
- OLSEN, J. V., BLAGOEV, B., GNAD, F., MACEK, B., KUMAR, C., MORTENSEN, P. & MANN, M. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127, 635-48.
- OMIATEK, D. M., BRESSLER, A. J., CANS, A. S., ANDREWS, A. M., HEIEN, M. L. & EWING, A. G. 2013. The real catecholamine content of secretory vesicles in the CNS revealed by electrochemical cytometry. *Sci Rep*, 3, 1447.
- OMORI, K. & KOTERA, J. 2007a. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res*, 100, 309-27.
- OMORI, K. & KOTERA, J. 2007b. Overview of PDEs and their regulation. *Circulation Research*, 100, 309-327.
- OORSCHOT, D. E. 1996. Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J Comp Neurol*, 366, 580-99.
- OUIMET, C. C., DA CRUZ E SILVA, E. F. & GREENGARD, P. 1995. The alpha and gamma 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3396-400.
- OUIMET, C. C., LANGLEY-GULLION, K. C. & GREENGARD, P. 1998. Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res*, 808, 8-12.
- OUIMET, C. C., MILLER, P. E., HEMMINGS, H. C., JR., WALAAS, S. I. & GREENGARD, P. 1984. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J Neurosci*, 4, 111-24.
- PAOLILLO, M., FELICIELLO, A., PORCELLINI, A., GARBI, C., BIFULCO, M., SCHINELLI, S., VENTRA, C., STABILE, E., RICCIARDELLI, G., SCHETTINI, G. & AVVEDIMENTO, E. V. 1999. The type and the localization of cAMP-dependent protein kinase regulate transmission of cAMP signals to the nucleus in cortical and cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 274, 6546-52.
- PATEL, T. B., DU, Z., PIERRE, S., CARTIN, L. & SCHOLICH, K. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*, 269, 13-25.

- PERREAULT, M. L., HASBI, A., O'DOWD, B. F. & GEORGE, S. R. 2014. Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. *Neuropsychopharmacology*, 39, 156-68.
- PICCONI, B., CENTONZE, D., HÅKANSSON, K., BERNARDI, G., GREENGARD, P., FISONE, G., CENCI, M. A. & CALABRESI, P. 2003. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci*, 6, 501-6.
- PICETTI, R., SAIARDI, A., ABDEL SAMAD, T., BOZZI, Y., BAIK, J. H. & BORRELLI, E. 1997. Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol*, 11, 121-42.
- PICKEL, V. M., NIRENBERG, M. J. & MILNER, T. A. 1996. Ultrastructural view of central catecholaminergic transmission: immunocytochemical localization of synthesizing enzymes, transporters and receptors. *J Neurocytol*, 25, 843-56.
- PLANERT, H., BERGER, T. K. & SILBERBERG, G. 2013. Membrane properties of striatal direct and indirect pathway neurons in mouse and rat slices and their modulation by dopamine. *PLoS One*, 8, e57054.
- POLITO, M., GUIOT, E., GANGAROSSA, G., LONGUEVILLE, S., DOULAZMI, M., VALJENT, E., HERVÉ, D., GIRAULT, J. A., PAUPARDIN-TRITSCH, D., CASTRO, L. R. & VINCENT, P. 2015. Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro*, 2.
- POLITO, M., KLARENBECK, J., JALINK, K., PAUPARDIN-TRITSCH, D., VINCENT, P. & CASTRO, L. R. 2013. The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci*, 7, 211.
- POPPE, H., RYBALKIN, S. D., REHMANN, H., HINDS, T. R., TANG, X. B., CHRISTENSEN, A. E., SCHWEDE, F., GENIESER, H. G., BOS, J. L., DOSKELAND, S. O., BEAVO, J. A. & BUTT, E. 2008. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods*, 5, 277-8.
- POTTER, L. R. 2011. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal*, 23, 1921-6.
- PRICKAERTS, J., HECKMAN, P. R. A. & BLOKLAND, A. 2017. Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 26, 1033-1048.
- RAJU, D. V., AHERN, T. H., SHAH, D. J., WRIGHT, T. M., STANDAERT, D. G., HALL, R. A. & SMITH, Y. 2008. Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *Eur J Neurosci*, 27, 1647-58.
- RANKIN, M. L., MARINEC, P. S., CABRERA, D. M., WANG, Z., JOSE, P. A. & SIBLEY, D. R. 2006. The D1 dopamine receptor is constitutively phosphorylated by G protein-coupled receptor kinase 4. *Mol Pharmacol*, 69, 759-69.

- REDGRAVE, P., RODRIGUEZ, M., SMITH, Y., RODRIGUEZ-OROZ, M. C., LEHERICY, S., BERGMAN, H., AGID, Y., DELONG, M. R. & OBESO, J. A. 2010. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 11, 760-72.
- REDROBE, J. P., JØRGENSEN, M., CHRISTOFFERSEN, C. T., MONTEZINHO, L. P., BASTLUND, J. F., CARNERUP, M., BUNDGAARD, C., LERDRUP, L. & PLATH, N. 2014. In vitro and in vivo characterisation of Lu AF64280, a novel, brain penetrant phosphodiesterase (PDE) 2A inhibitor: potential relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 3151-67.
- REDROBE, J. P., RASMUSSEN, L. K., CHRISTOFFERSEN, C. T., BUNDGAARD, C. & JØRGENSEN, M. 2015. Characterisation of Lu AF33241: A novel, brain-penetrant, dual inhibitor of phosphodiesterase (PDE) 2A and PDE10A. *Eur J Pharmacol*, 761, 79-85.
- REED, T. M., REPASKE, D. R., SNYDER, G. L., GREENGARD, P. & VORHEES, C. V. 2002. Phosphodiesterase 1B knock-out mice exhibit exaggerated locomotor hyperactivity and DARPP-32 phosphorylation in response to dopamine agonists and display impaired spatial learning. *J Neurosci*, 22, 5188-97.
- RENTERO, C., MONFORT, A. & PUIGDOMÈNECH, P. 2003. Identification and distribution of different mRNA variants produced by differential splicing in the human phosphodiesterase 9A gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 686-92.
- REPASKE, D. R., CORBIN, J. G., CONTI, M. & GOY, M. F. 1993. A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*, 56, 673-86.
- REYES-IRISARRI, E., PÉREZ-TORRES, S. & MENGOD, G. 2005. Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B mRNA in the rat brain. *Neuroscience*, 132, 1173-85.
- RICE, M. E. & CRAGG, S. J. 2008. Dopamine spillover after quantal release: rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. *Brain Res Rev*, 58, 303-13.
- RICE, M. E., PATEL, J. C. & CRAGG, S. J. 2011. Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience*, 198, 112-37.
- RICHFIELD, E. K., PENNEY, J. B. & YOUNG, A. B. 1989. Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 30, 767-77.
- RICHTER, W. & CONTI, M. 2004. The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 279, 30338-48.

- RIVERA, A., ALBERTI, I., MARTIN, A. B., NARVAEZ, J. A., DE LA CALLE, A. & MORATALLA, R. 2002. Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci*, 16, 2049-58.
- ROITMAN, M. F., WHEELER, R. A., WIGHTMAN, R. M. & CARELLI, R. M. 2008. Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nat Neurosci*, 11, 1376-7.
- RUSSWURM, C., KOESLING, D. & RUSSWURM, M. 2015. Phosphodiesterase 10A Is Tethered to a Synaptic Signaling Complex in Striatum. *J Biol Chem*, 290, 11936-47.
- SAMADI, P., ROUILLARD, C., BÉDARD, P. J. & DI PAOLO, T. 2007. Functional neurochemistry of the basal ganglia. *Handb Clin Neurol*, 83, 19-66.
- SAMPLE, V., DIPILATO, L. M., YANG, J. H., NI, Q., SAUCERMAN, J. J. & ZHANG, J. 2012. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cAMP. *Nature Chemical Biology*, 8, 375-382.
- SANTINI, E., VALJENT, E. & FISONE, G. 2008. Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J*, 275, 1392-9.
- SASAKI, T., KOTERA, J. & OMORI, K. 2002. Novel alternative splice variants of rat phosphodiesterase 7B showing unique tissue-specific expression and phosphorylation. *Biochem J*, 361, 211-20.
- SASAKI, T., KOTERA, J. & OMORI, K. 2004. Transcriptional activation of phosphodiesterase 7B1 by dopamine D1 receptor stimulation through the cyclic AMP/cyclic AMP-dependent protein kinase/cyclic AMP-response element binding protein pathway in primary striatal neurons. *J Neurochem*, 89, 474-83.
- SAWA, A. & SNYDER, S. H. 2005. Genetics. Two genes link two distinct psychoses. *Science*, 310, 1128-9.
- SCHMIDT, C. J. 2010. Phosphodiesterase inhibitors as potential cognition enhancing agents. *Curr Top Med Chem*, 10, 222-30.
- SCHMIDT, C. J., CHAPIN, D. S., CIANFROGNA, J., CORMAN, M. L., HAJOS, M., HARMS, J. F., HOFFMAN, W. E., LEBEL, L. A., MCCARTHY, S. A., NELSON, F. R., PROULX-LAFRANCE, C., MAJCHRZAK, M. J., RAMIREZ, A. D., SCHMIDT, K., SEYMOUR, P. A., SIUCIAK, J. A., TINGLEY, F. D., 3RD, WILLIAMS, R. D., VERHOEST, P. R. & MENNITI, F. S. 2008. Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 681-90.
- SCHOFFELMEER, A. N., HOGENBOOM, F., MULDER, A. H., RONKEN, E., STOOF, J. C. & DRUKARCH, B. 1994. Dopamine displays an identical apparent affinity towards functional dopamine D1 and D2 receptors in rat striatal slices: possible implications for the regulatory role of D2 receptors. *Synapse*, 17, 190-5.

- SCHRÖDER, K. F., HOPF, A., LANGE, H. & THÖRNER, G. 1975. [Morphometrical-statistical structure analysis of human striatum, pallidum and subthalamic nucleus]. *J Hirnforsch*, 16, 333-50.
- SCHULTZ, W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol*, 80, 1-27.
- SCHULTZ, W. 2007a. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci*, 30, 203-10.
- SCHULTZ, W. 2007b. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci*, 30, 259-88.
- SCHULTZ, W. 2015. Neuronal Reward and Decision Signals: From Theories to Data. *Physiol Rev*, 95, 853-951.
- SCHULTZ, W., DAYAN, P. & MONTAGUE, P. R. 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science*, 275, 1593-1599.
- SCHULTZ, W. & ROMO, R. 1988. Neuronal activity in the monkey striatum during the initiation of movements. *Exp Brain Res*, 71, 431-6.
- SCHULTZ, W. & ROMO, R. 1990. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to stimuli eliciting immediate behavioral reactions. *J Neurophysiol*, 63, 607-24.
- SCHWABE, U., MIYAKE, M., OHGA, Y. & DALY, J. W. 1976. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Mol Pharmacol*, 12, 900-10.
- SEAMANS, J. K. & YANG, C. R. 2004. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74, 1-57.
- SEEGER, T. F., BARTLETT, B., COSKRAN, T. M., CULP, J. S., JAMES, L. C., KRULL, D. L., LANFEAR, J., RYAN, A. M., SCHMIDT, C. J., STRICK, C. A., VARGHESE, A. H., WILLIAMS, R. D., WYLIE, P. G. & MENNITI, F. S. 2003. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res*, 985, 113-26.
- SEEMAN, P. 1980. BRAIN DOPAMINE-RECEPTORS. *Pharmacological Reviews*, 32, 229-313.
- SEEMAN, P. 1987. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, 1, 133-152.
- SHEN, W., FLAJOLET, M., GREENGARD, P. & SURMEIER, D. J. 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*, 321, 848-51.
- SHI, L. H., LUO, F., WOODWARD, D. J. & CHANG, J. Y. 2004. Neural responses in multiple basal ganglia regions during spontaneous and treadmill locomotion tasks in rats. *Exp Brain Res*, 157, 303-14.
- SHI, Y. 2009. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*, 139, 468-84.

- SHIH, J. C. 1991. Molecular basis of human MAO A and B. *Neuropsychopharmacology*, 4, 1-7.
- SHINDO, Y., IWAMOTO, K., MOURI, K., HIBINO, K., TOMITA, M., KOSAKO, H., SAKO, Y. & TAKAHASHI, K. 2016. Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling. *Nat Commun*, 7, 10485.
- SIMS, R. E. & DALE, N. 2014. Activity-dependent adenosine release may be linked to activation of Na(+)-K(+) ATPase: an in vitro rat study. *PLoS One*, 9, e87481.
- SIPPY, T., LAPRAY, D., CROCHET, S. & PETERSEN, C. C. 2015. Cell-Type-Specific Sensorimotor Processing in Striatal Projection Neurons during Goal-Directed Behavior. *Neuron*, 88, 298-305.
- SIUCIAK, J. A., CHAPIN, D. S., HARMS, J. F., LEBEL, L. A., MCCARTHY, S. A., CHAMBERS, L., SHRIKHANDE, A., WONG, S., MENNITI, F. S. & SCHMIDT, C. J. 2006a. Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology*, 51, 386-96.
- SIUCIAK, J. A., MCCARTHY, S. A., CHAPIN, D. S., FUJIWARA, R. A., JAMES, L. C., WILLIAMS, R. D., STOCK, J. L., MCNEISH, J. D., STRICK, C. A., MENNITI, F. S. & SCHMIDT, C. J. 2006b. Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology*, 51, 374-85.
- SIUCIAK, J. A., MCCARTHY, S. A., CHAPIN, D. S., REED, T. M., VORHEES, C. V. & REPASKE, D. R. 2007. Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme. *Neuropharmacology*, 53, 113-24.
- SKINBJERG, M., SIBLEY, D. R., JAVITCH, J. A. & ABI-DARGHAM, A. 2012. Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor in vivo: fact or fiction? *Biochem Pharmacol*, 83, 193-8.
- SKROBLIN, P., GROSSMANN, S., SCHÄFER, G., ROSENTHAL, W. & KLUSSMANN, E. 2010. Mechanisms of protein kinase A anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol*, 283, 235-330.
- SMITH, A. D. & BOLAM, J. P. 1990. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci*, 13, 259-65.
- SMITH, Y., BENNETT, B. D., BOLAM, J. P., PARENT, A. & SADIKOT, A. F. 1994. Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol*, 344, 1-19.
- SMITH, Y. & KIEVAL, J. Z. 2000. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 23, S28-33.

- SMITH, Y., RAJU, D. V., PARE, J. F. & SIDIBE, M. 2004. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci*, 27, 520-7.
- SMITH, Y. & VILLALBA, R. 2008. Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord*, 23 Suppl 3, S534-47.
- SMITH, Y., WICHMANN, T., FACTOR, S. A. & DELONG, M. R. 2012. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37, 213-46.
- SNYDER, G. L., FIENBERG, A. A., HUGANIR, R. L. & GREENGARD, P. 1998. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 18, 10297-303.
- SODERLING, S. H. & BEAVO, J. A. 2000. Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 174-9.
- SOKOLOFF, P., GIROS, B., MARTRES, M. P., BOUTHENET, M. L. & SCHWARTZ, J. C. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347, 146-51.
- SOKOLOFF, P. & LE FOLL, B. 2017. The dopamine D3 receptor, a quarter century later. *Eur J Neurosci*, 45, 2-19.
- SOMOGYI, P., BOLAM, J. P. & SMITH, A. D. 1981. Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J Comp Neurol*, 195, 567-84.
- SONG, R. S., MASSENBURG, B., WENDERSKI, W., JAYARAMAN, V., THOMPSON, L. & NEVES, S. R. 2013. ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 15437-42.
- STEPHENSON, D. T., COSKRAN, T. M., KELLY, M. P., KLEIMAN, R. J., MORTON, D., O'NEILL, S. M., SCHMIDT, C. J., WEINBERG, R. J. & MENNITI, F. S. 2012. The distribution of phosphodiesterase 2A in the rat brain. *Neuroscience*, 226, 145-55.
- STEPHENSON, D. T., COSKRAN, T. M., WILHELMS, M. B., ADAMOWICZ, W. O., O'DONNELL, M. M., MURAVNICK, K. B., MENNITI, F. S., KLEIMAN, R. J. & MORTON, D. 2009. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, 57, 933-49.
- STIPANOVICH, A., VALJENT, E., MATAMALES, M., NISHI, A., AHN, J.-H., MAROTEAUX, M., BERTRAN-GONZALEZ, J., BRAMI-CHERRIER, K., ENSLEN, H., CORBILLÉ, A.-G., FILHOL, O., NAIRN, A. C., GREENGARD, P., HERVÉ, D. & GIRAULT, J.-A. 2008. A phosphatase

- cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature*, 453, 879-885.
- STOOF, J. C. & KEBABIAN, J. W. 1981. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*, 294, 366-8.
- STRICK, C. A., JAMES, L. C., FOX, C. B., SEEGER, T. F., MENNITI, F. S. & SCHMIDT, C. J. 2010. Alterations in gene regulation following inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase, PDE10A. *Neuropharmacology*, 58, 444-51.
- SUN, W. L., ZHOU, L., HAZIM, R., QUINONES-JENAB, V. & JENAB, S. 2007. Effects of acute cocaine on ERK and DARPP-32 phosphorylation pathways in the caudate-putamen of Fischer rats. *Brain Res*, 1178, 12-9.
- SURMEIER, D. J., DING, J., DAY, M., WANG, Z. & SHEN, W. 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, 30, 228-35.
- SURMEIER, D. J., GRAVES, S. M. & SHEN, W. 2014. Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 29, 109-17.
- SUSANA, N.-Z. 2017. Phosphodiesterase diversity and signal processing within cAMP signaling networks. In: HAN-TING, Z., YING, X. & JAMES, O. D. (eds.) *Phosphodiesterases: CNS functions and diseases*. Springer.
- SVENNINGSSON, P., FOURREAU, L., BLOCH, B., FREDHOLM, B. B., GONON, F. & LE MOINE, C. 1999. Opposite tonic modulation of dopamine and adenosine on c-fos gene expression in striatopallidal neurons. *Neuroscience*, 89, 827-37.
- SVENNINGSSON, P., NISHI, A., FISONE, G., GIRAULT, J.-A., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2004a. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 269-296.
- SVENNINGSSON, P., NISHI, A., FISONE, G., GIRAULT, J. A., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. 2004b. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 269-96.
- SWAPNA, I., BONDY, B. & MORIKAWA, H. 2016. Differential Dopamine Regulation of Ca(2+) Signaling and Its Timing Dependence in the Nucleus Accumbens. *Cell Rep*, 15, 563-573.
- TANAKA, S. C., SCHWEIGHOFER, N., ASAH, S., SHISHIDA, K., OKAMOTO, Y., YAMAWAKI, S. & DOYA, K. 2007. Serotonin differentially regulates short- and long-term prediction of rewards in the ventral and dorsal striatum. *PLoS One*, 2, e1333.
- TASKEN, K. & AANDAHL, E. M. 2004. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137-67.
- TAYLOR, S. S., BUECHLER, J. A. & YONEMOTO, W. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 971-1005.

- TAYLOR, S. S., YANG, J., WU, J., HASTE, N. M., RADZIO-ANDZELM, E. & ANAND, G. 2004. PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1697, 259-69.
- TENNYSON, V. M., BARRETT, R. E., COHEN, G., CÔTÉ, L., HEIKKILA, R. & MYTILINEOU, C. 1973. Correlation of anatomical and biochemical development of the rabbit neostriatum. *Prog Brain Res*, 40, 203-17.
- TEPPER, J. M. & BOLAM, J. P. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 685-92.
- TEPPER, J. M., KOÓS, T. & WILSON, C. J. 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci*, 27, 662-9.
- THIBAUT, D., LOUSTALOT, F., FORTIN, G. M., BOURQUE, M. J. & TRUDEAU, L. 2013. Evaluation of D1 and D2 dopamine receptor segregation in the developing striatum using BAC transgenic mice. *PLoS One*, 8, e67219.
- THIELE, S. L., CHEN, B., LO, C., GERTLER, T. S., WARRE, R., SURMEIER, J. D., BROTHIE, J. M. & NASH, J. E. 2014. Selective loss of bi-directional synaptic plasticity in the direct and indirect striatal output pathways accompanies generation of parkinsonism and l-DOPA induced dyskinesia in mouse models. *Neurobiol Dis*, 71, 334-44.
- THRELFELL, S., CLEMENTS, M. A., KHODAI, T., PIENAAR, I. S., EXLEY, R., WESS, J. & CRAGG, S. J. 2010. Striatal muscarinic receptors promote activity dependence of dopamine transmission via distinct receptor subtypes on cholinergic interneurons in ventral versus dorsal striatum. *J Neurosci*, 30, 3398-408.
- THRELFELL, S., LALIC, T., PLATT, N. J., JENNINGS, K. A., DEISSEROTH, K. & CRAGG, S. J. 2012. Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, 75, 58-64.
- THRELFELL, S. & WEST, A. R. 2013. Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal Ganglia*, 3, 137-146.
- TOBIN, A. B. 2008. G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S167-76.
- TONG, J., FITZMAURICE, P. S., ANG, L. C., FURUKAWA, Y., GUTTMAN, M. & KISH, S. J. 2004. Brain dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol*, 55, 125-9.
- TORRECILLA, I. & TOBIN, A. B. 2006. Co-ordinated covalent modification of G-protein coupled receptors. *Curr Pharm Des*, 12, 1797-808.
- UCHIGASHIMA, M., OHTSUKA, T., KOBAYASHI, K. & WATANABE, M. 2016. Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic postsynaptic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 4206-11.

- UEKI, K., MURAMATSU, T. & KINCAID, R. L. 1992. Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun*, 187, 537-43.
- VALJENT, E., BERTRAN-GONZALEZ, J., HERVÉ, D., FISONE, G. & GIRAULT, J.-A. 2009. Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends in Neuroscience*, 32, 538-547.
- VAN DER KOOY, D. & FISHELL, G. 1987. Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res*, 401, 155-61.
- VAN DER STAAY, F. J., RUTTEN, K., BÄRFACKER, L., DEVRY, J., ERB, C., HECKROTH, H., KARTHAUS, D., TERSTEEGEN, A., VAN KAMPEN, M., BLOKLAND, A., PRICKAERTS, J., REYMANN, K. G., SCHRÖDER, U. H. & HENDRIX, M. 2008. The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology*, 55, 908-18.
- VASTA, V., SHIMIZU-ALBERGINE, M. & BEAVO, J. A. 2006. Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19925-30.
- VENTON, B. J., ZHANG, H., GARRIS, P. A., PHILLIPS, P. E., SULZER, D. & WIGHTMAN, R. M. 2003. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem*, 87, 1284-95.
- VENTRA, C., PORCELLINI, A., FELICIELLO, A., GALLO, A., PAOLILLO, M., MELE, E., AVVEDIMENTO, V. E. & SCHETTINI, G. 1996. The differential response of protein kinase A to cyclic AMP in discrete brain areas correlates with the abundance of regulatory subunit II. *J Neurochem*, 66, 1752-61.
- VOORN, P., VANDERSCHUREN, L. J., GROENEWEGEN, H. J., ROBBINS, T. W. & PENNARTZ, C. M. 2004. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci*, 27, 468-74.
- WAELEBROECK, I. 1999. Kinetics versus equilibrium: the importance of GTP in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 477-81.
- WAELETI, P., DICKINSON, A. & SCHULTZ, W. 2001. Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature*, 412, 43-8.
- WALAAS, S. I., ASWAD, D. W. & GREENGARD, P. 1983. A dopamine-and-cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature*, 301, 69-71.
- WALAAS, S. I., JR, H. C. H., GREENGARD, P. & NAIRN, A. C. 2011. Beyond the dopamine receptor: regulation and roles of serine/threonine protein phosphatase. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 1-17.
- WANG, H., FARHAN, M., XU, J., LAZAROVICI, P. & ZHENG, W. 2017. The involvement of DARPP-32 in the pathophysiology of schizophrenia. *Oncotarget*, 8, 53791-53803.

- WANG, P., WU, P., EGAN, R. W. & BILLAH, M. M. 2001. Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene*, 280, 183-94.
- WANG, P., WU, P., EGAN, R. W. & BILLAH, M. M. 2003. Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants. *Gene*, 314, 15-27.
- WATTS, V. J. & NEVE, K. A. 1996. Sensitization of endogenous and recombinant adenylylase by activation of D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol*, 50, 966-76.
- WATTS, V. J., WIENS, B. L., CUMBAY, M. G., VU, M. N., NEVE, R. L. & NEVE, K. A. 1998. Selective activation of Galphao by D2L dopamine receptors in NS20Y neuroblastoma cells. *J Neurosci*, 18, 8692-9.
- WEISS, S., SEBBEN, M., GARCIA-SAINZ, J. A. & BOCKAERT, J. 1985. D2-dopamine receptor-mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Mol Pharmacol*, 27, 595-9.
- WELCH, E. J., JONES, B. W. & SCOTT, J. D. 2010. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv*, 10, 86-97.
- WHITE, H. L. & WU, J. C. 1975. Properties of catechol O-methyltransferases from brain and liver of rat and human. *Biochem J*, 145, 135-43.
- WICKENS, J. R. 2009. Synaptic plasticity in the basal ganglia. *Behav Brain Res*, 199, 119-28.
- WILSON, C. J. & GROVES, P. M. 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*, 194, 599-615.
- WILSON, C. J. & GROVES, P. M. 1981. Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res*, 220, 67-80.
- WONG, W. & SCOTT, J. D. 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 959-70.
- WUNDER, F., TERSTEEGEN, A., REBMANN, A., ERB, C., FAHRIG, T. & HENDRIX, M. 2005. Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line. *Mol Pharmacol*, 68, 1775-81.
- XIE, G. X. & PALMER, P. P. 2007. How regulators of G protein signaling achieve selective regulation. *J Mol Biol*, 366, 349-65.
- XIE, Z., ADAMOWICZ, W. O., ELDRED, W. D., JAKOWSKI, A. B., KLEIMAN, R. J., MORTON, D. G., STEPHENSON, D. T., STRICK, C. A., WILLIAMS, R. D. & MENNITI, F. S. 2006. Cellular and subcellular localization of PDE10A, a striatum-enriched phosphodiesterase. *Neuroscience*, 139, 597-607.
- YAGISHITA, S., HAYASHI-TAKAGI, A., ELLIS-DAVIES, G. C., URAKUBO, H., ISHII, S. & KASAI, H. 2014. A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, 345, 1616-20.

- YANG, J. H., POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K., SMITH, J. S., SHIELDS, C. W. & SAUCERMAN, J. J. 2014. PKA catalytic subunit compartmentation regulates contractile and hypertrophic responses to β -adrenergic signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 66, 83-93.
- YAPO, C., NAIR, A. G., CLEMENT, L., CASTRO, L. R., HELLGREN KOTALESKI, J. & VINCENT, P. 2017. Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J Physiol*, 595, 7451-7475.
- YAPO, C., NAIR, A. G., HELLGREN KOTALESKI, J., VINCENT, P. & CASTRO, L. R. V. 2018. Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. *J Cell Sci*, 131.
- YGER, M. & GIRAULT, J. A. 2011. DARPP-32, Jack of All Trades... Master of Which? *Front Behav Neurosci*, 5, 56.
- YIN, H. H. & KNOWLTON, B. J. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci*, 7, 464-76.
- YUNG, K. K., BOLAM, J. P., SMITH, A. D., HERSCH, S. M., CILIAUX, B. J. & LEVEY, A. I. 1995. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience*, 65, 709-30.
- ZHANG, H. T., HUANG, Y., JIN, S. L., FRITH, S. A., SUVARNA, N., CONTI, M. & O'DONNELL, J. M. 2002. Antidepressant-like profile and reduced sensitivity to rolipram in mice deficient in the PDE4D phosphodiesterase enzyme. *Neuropsychopharmacology*, 27, 587-95.
- ZHANG, J., HUPFELD, C. J., TAYLOR, S. S., OLEFSKY, J. M. & TSIEN, R. Y. 2005. Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*, 437, 569-73.
- ZHANG, L., DOYON, W. M., CLARK, J. J., PHILLIPS, P. E. & DANI, J. A. 2009. Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. *Mol Pharmacol*, 76, 396-404.
- ZHANG, Y., MEREDITH, G. E., MENDOZA-ELIAS, N., RADEMACHER, D. J., TSENG, K. Y. & STEECE-COLLIER, K. 2013. Aberrant restoration of spines and their synapses in L-DOPA-induced dyskinesia: involvement of corticostriatal but not thalamostriatal synapses. *J Neurosci*, 33, 11655-67.
- ZIGMOND, R. E., SCHWARZSCHILD, M. A. & RITTENHOUSE, A. R. 1989. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci*, 12, 415-61.

Annexes

- **Revue : Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones**

Liliana Castro, Cedric Yapo et Pierre Vincent

Biologie Aujourd'hui - Volume 210 / Numéro 4 (2016)

Physiopathologie de la signalisation AMPc/PKA dans les neurones

Liliana Castro, Cedric Yapo et Pierre Vincent

Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Unité Mixte de Recherche "Biologie Adaptative et Vieillesse" UMR8256, 9 quai St Bernard, 75252 Paris Cedex 5, France

Auteur correspondant : Liliana Castro : liliana.ribeiro_vivas_de_castro@upmc.fr

Reçu le 17 janvier 2017

Résumé – La dopamine joue un rôle majeur dans diverses fonctions cérébrales comme la récompense, l'apprentissage, la régulation des comportements moteurs, etc. Des dysfonctionnements dans la signalisation dopaminergique sont associés à de nombreuses maladies neuropsychiatriques, telles que la schizophrénie, la toxicomanie ou la maladie de Parkinson. La dopamine exerce ses effets cellulaires principalement par la modulation de la voie AMPc/PKA qui, dans les neurones, joue un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses propriétés cellulaires comme la croissance axonale, l'efficacité de la transmission synaptique, ou encore l'excitabilité et la plasticité neuronale. Cette cascade de signalisation est confinée dans des domaines subcellulaires spécifiques ainsi que sur une échelle de temps précise. Le développement de biosenseurs optiques codés génétiquement pour mesurer l'AMPc ou l'activité PKA a considérablement amélioré notre compréhension de ces processus dans les neurones vivants : ils permettent un suivi des cascades de signalisation, avec une résolution temporelle de quelques secondes, à l'échelle cellulaire et même subcellulaire. Dans cette revue, nous décrivons des données récentes qui mettent en évidence les caractéristiques spatiales et temporelles de la cascade AMPc/PKA lors de l'intégration de signaux neuromodulateurs, en particulier par la dopamine. L'imagerie de biosenseurs, en fournissant une haute résolution de lecture de ces événements, émerge aujourd'hui comme un outil de pointe pour décrypter les mécanismes subtils de la signalisation intracellulaire.

Mots clés : Protéine kinase A / AMP cyclique / phosphodiesterases / imagerie de biosenseurs / dopamine

Abstract – Physiopathology of cAMP/PKA signaling in neurons.

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and the cyclic-AMP dependent protein kinase (PKA) regulate a plethora of cellular functions in virtually all eukaryotic cells. In neurons, the cAMP/PKA signaling cascade controls a number of biological properties such as axonal growth, synaptic transmission, regulation of excitability or long term changes in the nucleus. Genetically-encoded optical biosensors for cAMP or PKA considerably improved our understanding of these processes by providing a real-time measurement in living neurons. In this review, we describe the recent progresses made in the creation of biosensors for cAMP or PKA activity. These biosensors revealed profound differences in the amplitude of the cAMP signal evoked by neuromodulators between various neuronal preparations. These responses can be resolved at the level of individual neurons, also revealing differences related to the neuronal type. At the subcellular level, biosensors reported different signal dynamics in domains like dendrites, cell body, nucleus and axon. Combining this imaging approach with pharmacology or genetical models points at phosphodiesterases and phosphatases as critical regulatory proteins. Biosensor imaging will certainly help understand the mechanism of action of current drugs as well as help in devising novel therapeutic strategies for neuropsychiatric diseases.

Key words: Protein kinase A / cyclic AMP / phosphodiesterases / biosensor imaging / dopamine

Abréviations

AC	adénylyl cyclase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AKAR	capteur de l'activité PKA
AKAP	protéine d'ancrage de la PKA
C	sous-unité catalytique de la PKA
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i>
CNG	canaux activés par les nucléotides cycliques
CREB	facteur de transcription régulé par l'AMPc
DARPP-32	<i>Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein</i>
Epac	protéine d'échange directement activée par l'AMPc
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster
GCs	guanylyl cyclase soluble
Gi	protéine G inhibitrice
Gs	protéine G stimulatrice
HCN	canaux activés par hyperpolarisation et par les nucléotides cycliques
NO	oxyde nitrique
PDE	phosphodiesterase
PKA	protéine kinase A
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc
PP1	protéine phosphatase de type 1
R	sous-unité catalytique de la PKA
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>

Introduction

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la protéine kinase A (PKA) sont impliquées dans pratiquement tous les processus physiologiques. La stimulation de certains récepteurs couplés aux protéines G conduit à l'activation de protéines stimulatrices (Gs) ou inhibitrices (Gi), qui à leur tour modulent l'activité des adénylyl cyclases (AC) et la production d'AMPc. L'AMPc affecte différents types d'effecteurs en aval, comme des canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG) (Craven & Zagotta, 2006), les canaux cationiques activés par l'hyperpolarisation de la famille I_h (Kaupp & Seifert, 2001), la protéine d'échange directement activée par l'AMPc (Epac) (Gloerich & Bos, 2010), ou encore la protéine kinase AMPc-dépendante ou protéine kinase A (PKA) (Taylor *et al.*, 1990; Tasken & Aandahl, 2004).

La PKA est un tétramère constitué de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous-unités catalytiques (C). Lors de la fixation de l'AMPc à la PKA, les sous-unités C se dissocient des sous-unités R, et phosphorylent une multitude de protéines cibles. Le signal AMPc/PKA, comme beaucoup d'autres signaux

cellulaires, a lieu dans l'espace complexe de la cellule vivante. Dans la dimension temporelle, le signal AMPc/PKA augmente à la suite d'un stimulus neuromodulateur, puis diminue au fil du temps lorsque le stimulus cesse et/ou lorsque des mécanismes de rétroaction ramènent ce dernier vers le niveau de base. La dimension spatiale joue également un rôle important car la concentration en molécules de signalisation diminue avec la distance : l'AMPc diffuse dans le volume cytosolique tout en étant dégradé par les phosphodiesterases, des processus classiquement modélisés par des équations de réaction-diffusion. Les interactions protéine-protéine, telles que celles médiées par des protéines d'ancrage comme les AKAP, maintiennent à proximité tous les partenaires de la cascade de signalisation au sein de « microdomaines de signalisation » (Bockaert *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2013). En plus de ces facteurs, la géométrie de la cellule peut affecter l'intégration du signal, avec un rapport surface/volume élevé favorisant l'accumulation d'AMPc et l'activation forte de la PKA dans des domaines cellulaires de petite taille (Neves *et al.*, 2008). Ces caractéristiques temporelles et spatiales de l'intégration des signaux neuromodulateurs sont particulièrement critiques dans le cas des neurones : ces cellules présentent des domaines morphologiques complexes tels que l'arbre dendritique, les épines, le corps cellulaire, les axones... chacun doté de fonctions spécifiques. Des méthodologies telles que les biosenseurs optiques codés génétiquement permettent ainsi d'analyser les dimensions temporelles et spatiales de l'intégration d'un signal neuromodulateur dans un neurone (Zhang *et al.*, 2002; Miyawaki, 2003).

De nombreux biosenseurs ont été créés pour différents signaux biologiques (Lalonde *et al.*, 2005; Van Engelenburg & Palmer, 2008; Carlson & Campbell, 2009; Morris, 2010; Sipietar *et al.*, 2013), certains d'entre eux étant conçus plus spécifiquement pour des applications dans les neurosciences, comme les biosenseurs pour la mesure du calcium intracellulaire ou du potentiel de membrane (Knopfel, 2012; Looger & Griesbeck, 2012) ou encore des biosenseurs sensibles au glutamate (Okumoto *et al.*, 2005; Dulla *et al.*, 2008; Hires *et al.*, 2008; Marvin *et al.*, 2013). Dans ce domaine en pleine expansion, cette revue se concentre spécifiquement sur la cascade de signalisation AMPc/PKA dans les neurones.

Biosenseurs FRET pour évaluer les signaux AMPc ou PKA

L'utilisation d'approches biochimiques telles que le dosage radio-immunologique permet la mesure des concentrations d'AMPc totaux ou des activités kinases dans des tissus ou des homogénats de cellules.

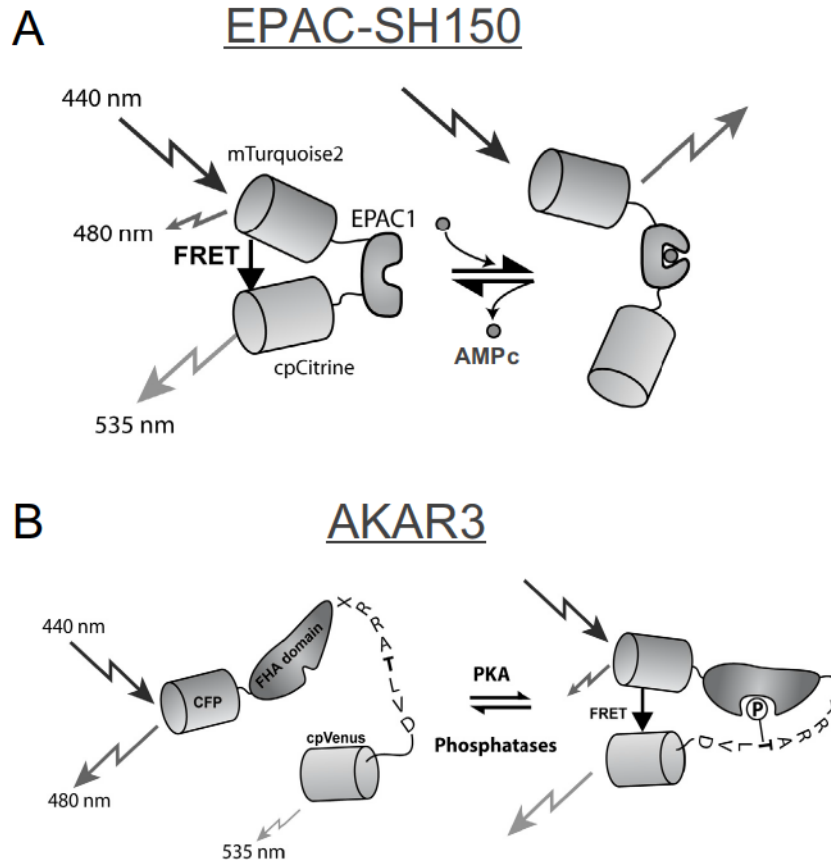


Fig. 1. Biosenseurs FRET pour l'AMPc et la PKA. A) Biosenseur EpaSH¹⁵⁰, sonde AMPc constituée du domaine de fixation à l'AMPc de la protéine Epac1, d'un fluorophore donneur, la mTurquoise2, et d'un fluorophore accepteur, la cp174Citrine. La fixation d'une molécule d'AMPc au domaine senseur de la sonde EpaSH¹⁵⁰ occasionne l'éloignement des deux fluorophores, et une diminution du transfert d'énergie entre les deux fluorophores. B) AKAR3, sonde PKA constituée d'un domaine substrat de la PKA, d'un domaine de reconnaissance des acides aminés phosphorylés (le domaine FHA, *Forkhead-associated domain*), d'un fluorophore donneur, la CFP, et d'un fluorophore accepteur, la cpVenus. La phosphorylation par la PKA du résidu thréonine inclus dans le domaine senseur de la sonde AKAR3 occasionne le rapprochement des deux fluorophores, et une augmentation du transfert d'énergie entre eux. L'augmentation du rapport de fluorescence accepteur/donneur (ratio F535/F480) reflète l'équilibre entre l'activité de phosphorylation par la PKA et de déphosphorylation par les phosphatases.

Bien que très spécifiques et sensibles, ces approches nécessitent de grandes quantités de cellules ou de tissu, ce qui rend impossible d'analyser en temps réel et dans des domaines subcellulaires la dynamique de ces événements. Les canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques comme les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG et HCN) (Craven & Zagotta, 2006) fournissent un moyen de suivre les variations de concentration en AMPc avec une excellente résolution temporelle, grâce à des enregistrements électrophysiologiques. De plus, les canaux CNG ont été modifiés pour améliorer leur sensibilité pour l'AMPc (Rich *et al.*, 2001b) et cette approche a fourni des informations importantes au sujet de la compartimentation sous-membranaire du signal AMPc (Rich *et al.*, 2001a). L'utilisation de ces canaux est cepen-

dant difficile dans les neurones où leur expression serait susceptible de perturber l'excitabilité en provoquant une entrée de calcium, et les enregistrements électrophysiologiques ne fournissent aucune information spatiale. Le développement de biosenseurs FRET a permis de surmonter ces limites en rendant possible la visualisation des fluctuations AMPc ou PKA dans des cellules individuelles, avec une haute résolution spatiale et temporelle.

Les biosenseurs basés sur le principe de FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster) sont constitués d'un domaine sensible au signal biologique d'intérêt disposé entre une paire de fluorophores, le donneur et l'accepteur (Figure 1). Le FRET est le processus physique par lequel l'énergie d'un fluorophore excité (le donneur) est transférée par résonance

à un fluorophore voisin (l'accepteur). Ce phénomène dépend fortement de la distance et/ou de l'orientation relative entre le donneur et l'accepteur (Wouters *et al.*, 2001; Jares-Erijman & Jovin, 2003). Dans un biosenseur FRET, le signal biologique, par exemple l'AMPc, déclenche un changement de conformation du domaine sensible, ce qui modifie l'efficacité de FRET entre donneur et accepteur, conduisant à des changements de leurs intensités (ou durée de vie) de fluorescence. Ces variations dans les propriétés de fluorescence sont mesurables en temps réel par microscopie optique sur des cellules vivantes exprimant ces biosenseurs.

Certaines limitations de l'imagerie de biosenseurs comprennent la sensibilité à la photodestruction des fluorophores, le pH et la température, et il est donc souhaitable d'utiliser les fluorophores les plus brillants et les plus stables. Ainsi, profitant du fluorophore donneur Turquoise dérivé de la CFP et utilisant le squelette de la protéine Epac1, le biosenseur ^TEpac^{VV} présente une photostabilité fortement accrue et un signal d'amplitude remarquable (Klarenbeek *et al.*, 2011). L'amélioration radicale des propriétés de biosenseur a ouvert de nouvelles possibilités, en particulier en neurobiologie (Polito *et al.*, 2013).

Au-delà de la mesure directe de sa concentration, les effets de l'AMPc sur l'activité PKA peuvent être étudiés en utilisant un biosenseur de l'activité PKA de type AKAR. Les biosenseurs FRET de type AKAR sont composés d'un domaine qui se lie sur les peptides phosphorylés et d'un substrat spécifique de la PKA, l'ensemble étant placé entre les fluorophores de type CFP et YFP : lorsque le domaine substrat est phosphorylé par la PKA, le domaine de reconnaissance des phosphoamino-acides s'y lie, ce qui entraîne un changement de conformation, conduisant à une augmentation de FRET entre la CFP et la YFP. Bien que communément nommés « biosenseurs PKA », il faut garder à l'esprit que le niveau de phosphorylation de ces derniers reflète l'équilibre entre la phosphorylation effectuée par PKA d'une part et la déphosphorylation effectuée par les phosphatases d'autre part.

Après la première preuve de concept de AKAR1, qui manquait de réversibilité (Zhang *et al.*, 2001), AKAR2 fut un rapporteur efficace (Zhang *et al.*, 2005), et a été remplacé rapidement par AKAR3, dans lequel l'accepteur a été substitué par une citrine permutée circulairement (Allen & Zhang, 2006). Par la suite, le changement du donneur par une protéine céruleenne plus brillante donna naissance à AKAR4 (Depry *et al.*, 2011) tandis que le changement par une aquamarine (AqAKARcit) améliora la photostabilité et la résistance au pH (Erard *et al.*, 2013). Ces étapes illustrent le long processus de création des biosenseurs qui, grâce au criblage à haut débit, permettent d'obtenir des améliorations rationnelles comme l'utilisation

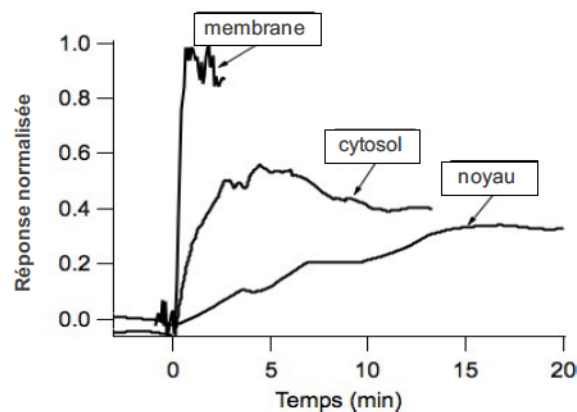


Fig. 2. Cinétique et amplitude des réponses PKA à la membrane, dans le cytosol et dans le noyau dans les neurones thalamiques intralaminaires, à la suite de l'activation des récepteurs à la sérotonine de type 5-HT₇. L'activation de la PKA à la membrane a été mesurée à l'aide des enregistrements de patch-clamp du courant potassique sensible à la PKA. L'activation de la PKA dans le cytosol et dans le noyau a été mesurée par imagerie rationométrique, en utilisant les biosenseurs AKAR2 et AKAR2-NLS.

de fluorophores plus performants, le tout agrémenté de coups de chance occasionnels.

Une stratégie similaire a été suivie pour suivre le niveau de phosphorylation de la protéine CREB, un facteur de transcription essentiel. CREB est phosphorylé par la PKA, ainsi que par la kinase dépendante de la calmoduline de type IV et par les MAP kinases. Ce biosenseur, appelé ICAP, mesure le niveau d'activation de CREB après phosphorylation par la PKA ou par les MAP kinases (Friedrich *et al.*, 2010).

Analyse spatiale du signal AMPc/PKA dans les neurones

Grâce à la microscopie optique, l'imagerie de biosenseurs permet d'acquérir des données dans une dimension spatiale bien définie, que ce soit dans des neurones individualisés ou dans des compartiments subcellulaires spécifiques.

Des biosenseurs dérivés d'Epac ou de type AKAR ont démontré que l'intégration du signal diffère selon le domaine subcellulaire considéré. Par exemple, dans les dendrites fins et/ou le compartiment sous-membranaire, les neuromodulateurs produisent des effets rapides (< 1 min) et puissants sur l'excitabilité de la membrane, conformément à un couplage fonctionnel très efficace entre les récepteurs, les cyclases, la PKA et les canaux cibles. En revanche, le signal PKA dans le cytosol du corps cellulaire est plus lent (~ 6 min) et d'amplitude moindre. Enfin, le noyau intègre ces signaux cytosoliques sur des périodes de plusieurs dizaines de minutes (Figure 2),

conformément à la diffusion passive de la sous-unité catalytique de la PKA libre dans le noyau, ce qui résulte en une modulation graduelle de l'expression génique (Gervasi *et al.*, 2007).

Des réponses à la forskoline plus rapides ont été observées dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal (60 s), dans les neurones épineux moyens du striatum (25 s) (Castro *et al.*, 2013), et dans les cellules ganglionnaires de rétine (20 s) (Dunn *et al.*, 2006).

Les neurones striataux, à l'inverse de la majorité des autres types cellulaires y compris neuronaux, ont une capacité spécifique de décoder des signaux dopaminergiques très brefs (Castro *et al.*, 2013). Ces signaux dopaminergiques phasiques ont été mimés par la libération de dopamine à partir d'un composé « cagé », le (*N*)-1-(2-Nitrophényl)éthylcarboxy-3,4-dopamine (NPEC-dopamine), sous l'effet d'un flash de lumière ultraviolette, tandis qu'en parallèle, l'activité PKA était mesurée avec la sonde AKAR3. Pour le cortex et pour le striatum, cette libération quasi-instantanée de dopamine a induit des augmentations transitoires du ratio d'émission d'AKAR3. Cependant, les réponses globales ont différé considérablement entre les deux régions cérébrales : les neurones corticaux ont été peu sensibles à la dopamine, alors que les neurones striataux ont activé la PKA de manière quasi maximale. Autre fait important, seuls les neurones striataux ont vu augmenter l'expression des gènes *c-fos* après cette stimulation brève, montrant leur capacité à répondre très rapidement à ce stimulus neuromodulateur au niveau génique. De telles différences ont été associées à l'expression différentielle des protéines de signalisation comme les phosphodiésterases (PDE), les adénylyl cyclases, ou la DARPP-32, qui déterminent les propriétés intégratives de chaque neurone (Castro *et al.*, 2013).

Chez la drosophile, l'imagerie de biosenseurs a révélé des réponses différentes à la dopamine, à l'octopamine, ou à la forskoline dans différents domaines cellulaires (Tomchik & Davis, 2009; Gervasi *et al.*, 2010).

Pour comprendre les règles qui déterminent la propagation du signal AMPc depuis les dendrites jusqu'au noyau, une étude a combiné modélisation informatique et imagerie de biosenseurs, ce qui a permis d'étudier la relation inattendue entre la distance des stimuli par rapport au corps cellulaire du neurone et l'activation de la PKA dans son noyau (Li *et al.*, 2015). De manière inattendue, l'efficacité de la production de l'AMPc pour déclencher des réponses nucléaires n'est pas une fonction linéaire décroissant avec la distance depuis le corps cellulaire, mais est clairement non linéaire en raison de la géométrie dendritique, qui est susceptible d'amplifier les signaux en aval de l'AMPc et de contrebalancer les effets de la distance entre le noyau et le site d'activation.

L'imagerie simultanée des signaux calciques et AMPc/PKA a également apporté un nouveau regard sur l'interaction entre ces deux cascades de signalisation dans des types cellulaires non neuronaux variés (Landa *et al.*, 2005; Harbeck *et al.*, 2006; Willoughby & Cooper, 2006). La même approche quantitative appliquée à des neurones présentant une activité spontanée a montré des interactions directes entre le calcium périodique et des changements transitoires d'AMPc. Cela a été illustré dans les neurones de la moelle épinière en développement dans lesquels un signal calcique a déclenché des augmentations transitoires en AMPc, et réciproquement, les niveaux d'AMPc régulaient la fréquence des transitoires calciques (Gorbunova & Spitzer, 2002). Dans les cellules ganglionnaires de rétine, l'activation du signal AMPc/PKA par le calcium résulte de l'activité combinée des adénylyl cyclases transmembranaires et solubles (Dunn *et al.*, 2009). Plus récemment, Nicol *et al.* (2011) ont décrit que l'interaction calcium/AMPc varie selon les régions du cône de croissance des neurones chez le xénope.

Des analyses plus poussées sur la compartimentation subcellulaire du signal AMPc/PKA peuvent être réalisées en utilisant des séquences d'adressage pour localiser le biosenseur dans d'autres domaines subcellulaires d'intérêt. Cela a été effectué dans des cellules non neuronales variées (Zhang *et al.*, 2001; Allen & Zhang, 2006; Wachten *et al.*, 2010) mais pas appliqué dans des préparations neuronales jusqu'à présent. Cette tâche pourrait s'avérer difficile car de nombreux artefacts peuvent être causés par l'expression de grandes quantités de biosenseurs localisés dans un domaine cellulaire restreint, allant d'effets environnementaux sur le signal de fluorescence du biosenseur à une perturbation des microdomaines de signalisation par le biosenseur en lui-même. De façon alternative, l'imagerie de biosenseurs pourrait s'avérer utile pour l'analyse de l'effet des perturbations des microdomaines de signalisation sur la propagation intracellulaire et l'intégration du signal : à titre d'exemple, l'inhibition de l'interaction PKA/AKAP avec le peptide Ht31 ou l'interférence ARN (shARN) diminuent fortement l'efficacité du signal AMPc sur la phosphorylation de CREB, résultats apportés par le biosenseur ICAP (Friedrich *et al.*, 2010).

Amplitude du signal AMPc/PKA

De fortes réponses AMPc aux stimulations beta-adrénergiques ont été enregistrées avec la sonde Epac1-camps dans des types cellulaires variés comme les macrophages, les cardiomyocytes, ou les fibroblastes (Leroy *et al.*, 2008; Calebiro *et al.*, 2009). Des lignées cellulaires ont également démontré leur capacité à produire de fortes réponses AMPc, telle la lignée

de cellules pancréatiques MIN6 (Landa *et al.*, 2005), qui répond fortement au glucose, ou la lignée de cellules HEK-293, qui répond à l'activation du récepteur β 2-adrénargique (Violin *et al.*, 2008). Dans les neurones, des oscillations spontanées des niveaux d'AMPc ont été enregistrées dans des cellules ganglionnaires de rétine en culture, avec une sonde de faible sensibilité pour l'AMPc (Dunn *et al.*, 2006), et de fortes réponses AMPc ont été enregistrées avec la sonde Epac1-camps après stimulation β -adrénargique dans des neurones de l'hippocampe en cultures primaires (Nikolaev *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2008; Calebiro *et al.*, 2009), ou après stimulation par l'ATP dans des tranches de tronc cérébral en culture (Mironov *et al.*, 2009).

À l'inverse de ces fortes réponses, dans le cytosol de neurones pyramidaux, seules de petites réponses ont été enregistrées avec les biosenseurs de l'AMPc à la suite de l'activation de divers récepteurs couplés à des protéines Gs : les récepteurs aux monoamines (récepteurs β -adrénargiques et D1-dopaminergiques), ainsi que les récepteurs aux neuropeptides (VIP, CRF, PACAP) ont tous échoué à activer la sonde Epac1-camps, une sonde dont l' EC_{50} pour l'AMPc est de 2,4 μ M (Castro *et al.*, 2010, 2013; Hu *et al.*, 2011). Cependant, lorsque les agonistes des récepteurs β 1-adrénargiques ou D1-dopaminergiques ont été testés avec la sonde plus sensible Epac2-camps300, des réponses positives ont été obtenues (Castro *et al.*, 2010, 2013). Au niveau de la PKA, l'activation de ces divers récepteurs a produit des réponses allant de 20 à 80 % de la réponse maximale (Hu *et al.*, 2011; Nomura *et al.*, 2014), montrant qu'en dépit des petites quantités d'AMPc produites par l'activation de ces récepteurs, la PKA était, quant à elle, efficacement activée dans le cytosol. Cette observation a ensuite été précisée pour le récepteur D1-dopaminergique dans les neurones corticaux pyramidaux, et trois biosenseurs différents ont apporté des réponses d'amplitude croissante, en accord avec la sensibilité croissante de ces derniers : Epac1camps < Epac2-camps300 < AKAR3 (Castro *et al.*, 2013). En somme, ces données montrent que l'activation de divers récepteurs couplés aux protéines Gs dans les neurones corticaux pyramidaux amène à de petites réponses AMPc, de l'ordre du micromolaire, mais suffisantes pour activer la PKA. Des études de modélisation ont suggéré que la concentration en AMPc libre dans le corps cellulaire était d'environ 250 nM durant la stimulation des récepteurs β 1-adrénargiques : cette faible concentration en AMPc résulterait d'une production d'AMPc par les adénylyl cyclases conjuguée à une forte activité des phosphodiéstérases, en particulier celle de type 4 (PDE4), exerçant un rôle majeur dans la dégradation de l'AMPc dans ces neurones (Neves *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010). Ce faible niveau d'AMPc dans les

neurones matures présents dans des préparations de tranches de cerveau contraste avec les fortes réponses AMPc obtenues dans les neurones de cultures embryonnaires, suggérant que le niveau d'AMPc pourrait être fonction du stade de développement : les neurones indifférenciés auraient besoin de niveaux élevés en AMPc pour croître et établir leurs connexions (Dunn & Feller, 2008), un processus qui pourrait être lié à l'expression d'autres types d'adénylyl cyclases telles que l'AC8 dans les neurones embryonnaires, et qui serait nécessaire à la différenciation axonale et dendritique (Shelly *et al.*, 2010). Plus tard, lorsque les connexions sont établies, le maintien de hauts niveaux d'AMPc s'avèrerait inutilement coûteux pour les neurones, et le maintien en parallèle de bas niveaux d'AMPc serait nécessaire à l'établissement d'une compartimentation subcellulaire des réponses AMPc. En cela, la PDE4 est critique pour le maintien de cette compartimentation subcellulaire dans les neurones pyramidaux où de hauts niveaux d'AMPc ne sont produits que dans l'espace sous-membranaire (Castro *et al.*, 2010).

Cependant, ce modèle ne s'applique pas à toutes les régions cérébrales : à la différence des neurones corticaux pyramidaux, les neurones épineux striataux répondent à l'activation du récepteur D1-dopaminergique en produisant de hauts niveaux d'AMPc (Castro *et al.*, 2013). Un certain nombre de spécificités biochimiques des neurones striataux, comme un déficit d'activité PDE4, une activité des adénylyl cyclases importante, et un mécanisme de rétrocontrôle positif exercé au niveau des phosphatases suggère que ces neurones sont spécialement équipés pour produire d'importants niveaux d'AMPc. On pense que cette particularité est liée à la fonction de ces neurones, impliqués dans la détection des signaux dopaminergiques très brefs associés à un signal de récompense.

Régulation par les phosphodiéstérases et phosphatases

Le fonctionnement du cerveau fait intervenir un grand nombre de neuromodulateurs, et la régulation de la signalisation par les seconds messagers y est donc particulièrement complexe. Le signal AMPc/PKA débute à un moment précis par la libération de neuromodulateurs, déclenchant une série de réponses activatrices, suivies de près par des mécanismes de rétroaction négative qui permettent à la cellule de revenir à l'état « de base ». Ces contrôles négatifs comprennent les phosphodiéstérases qui dégradent efficacement les nucléotides cycliques, et les phosphatases qui contre-carrent l'action de la PKA.

Les 21 gènes qui composent les 11 familles de PDE sont transcrits en plus de 50 variants par épissage alternatif, traduits en enzymes aux propriétés parfois différentes, avec des distributions intracellulaires uniques et des domaines régulateurs particuliers. Par exemple, dans les cellules ganglionnaires de la rétine, la signalisation AMPc/PKA stimulée par le calcium est fortement régulée par la PDE1, qui est elle-même activée par le calcium (Dunn *et al.*, 2009). Cette variété de cascades biochimiques dépendant du calcium converge ensuite vers une régulation du signal AMPc à la fois dans le temps et dans l'espace.

Dans les neurones pyramidaux du cortex, l'utilisation de biosenseurs a permis de démontrer que la PDE4 est un intégrateur crucial des réponses adrénérgiques et dopaminérgiques, permettant la compartimentation subcellulaire du signal d'AMPc (Castro *et al.*, 2010). En effet, dans le cytosol somatique, la PDE4 régule étroitement l'amplitude des réponses AMPc alors que dans les dendrites fins, où le rapport surface/volume est augmenté, la PDE4 contrôle la production tonique d'AMPc produit par les adénylyl cyclases tandis que la géométrie facilite l'obtention de concentrations élevées en AMPc (Neves *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2010, 2013).

Les premières études de réponses AMPc utilisant la sonde Epac1-camps dans des neurones individuels de drosophiles ont révélé l'existence de sous-populations spécifiques de neurones répondant différemment à un même neuromodulateur (Shafer *et al.*, 2008; Duvall & Taghert, 2012). Cette mesure à l'échelle de neurones individuels s'est révélée essentielle pour l'étude des neurones épineux moyens, qui constituent l'essentiel de la population neuronale du striatum : environ la moitié d'entre eux exprime des récepteurs à la dopamine du type D1 et appartient anatomiquement à la « voie directe », alors que l'autre moitié exprime des récepteurs à la dopamine du type D2, ainsi que des récepteurs A2A à l'adénosine, et appartient à la « voie indirecte » (Bateup *et al.*, 2008; Bertran-Gonzalez *et al.*, 2008). Les récepteurs à la dopamine du type D1 et les récepteurs A2A à l'adénosine sont couplés positivement à la cascade de signalisation intracellulaire AMPc/PKA, alors que les récepteurs à la dopamine du type D2 sont couplés négativement à la cascade AMPc/PKA. En microscopie bi-photonique, l'imagerie de biosenseurs montre clairement cette dichotomie, avec la moitié des neurones striataux qui répond à l'activation du récepteur D1, alors que l'autre moitié répond à la stimulation des récepteurs A2A (Castro *et al.*, 2013; Polito *et al.*, 2015). Cette approche d'imagerie permet ainsi l'analyse spécifique des réponses AMPc/PKA dans des neurones fonctionnels identifiés et individualisés dans le contexte anatomique intact de la tranche de cerveau.

La complexité de la régulation exercée par les PDE est illustrée dans les neurones du striatum, qui expriment des niveaux élevés d'ARN messager des PDE1B, PDE2A et PDE10A (Seeger *et al.*, 2003; Coskran *et al.*, 2006; Heiman *et al.*, 2008; Lakics *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2014). Ces enzymes sont capables de dégrader l'AMPc et le cGMP, mais leur distribution subcellulaire et/ou leur mise en action par des mécanismes particuliers permet une action fonctionnelle spécifique.

Par exemple, la PDE10A régule le taux tonique d'AMPc, et son inhibition induit une augmentation équivalente de la concentration intracellulaire de l'AMPc dans les neurones D1 et D2 (Figure 3). Étonnamment, le signal PKA a été observé exclusivement dans les neurones D2 MSN. Cette différence entre les neurones D1 et D2 est due à l'activité de la protéine phosphatase de type 1 (PP1). Celle-ci est très active dans les neurones D1 et annule l'effet de la PKA en déphosphorylant aussitôt les substrats de la PKA. En revanche, dans les neurones D2, la protéine DARPP-32 inhibe fortement l'activité PP1. En l'absence de cette activité phosphatase, la PKA exerce des effets puissants et durables (Polito *et al.*, 2015).

Interaction AMPc / GMPc : rôle de la PDE2

Les effets fonctionnels de la cascade de signalisation AMPc ont été largement documentés dans le striatum (Hervé & Girault, 2005) mais la signalisation cGMP est beaucoup moins connue. Le cGMP est produit par la guanylyl cyclase soluble (GCs) en réponse à l'oxyde nitrique (NO) et régule divers processus neurobiologiques (Garthwaite, 2008). La guanylyl cyclase soluble est fortement exprimée dans le striatum (Ariano *et al.*, 1982; Matsuoka *et al.*, 1992; Ding *et al.*, 2004) tandis que le NO, produit par des interneurons striataux (Vincent & Kimura, 1992; Rushlow *et al.*, 1995; Kawaguchi, 1997; Vincent, 2000), diffuse dans tout le complexe striatal, augmentant la transmission synaptique dopaminérgique (West *et al.*, 2002; West & Grace, 2004; West & Tseng, 2011). Plus précisément, le NO diffuse dans les dendrites des neurones du striatum et y module la plasticité synaptique cortico-striatale *in vitro* (Calabresi *et al.*, 1999, 2000) et *in vivo* (West & Grace, 2004). Bien que ces effets impliquent clairement le GMPc, l'identité moléculaire des effecteurs en aval du cGMP reste incertaine, en particulier parce que la cible habituelle du GMPc, la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG), est faiblement exprimée dans ces neurones (El-Husseini *et al.*, 1995, 1999; de Vente *et al.*, 2001).

Fait intéressant, les régions du cerveau telles que l'hippocampe et le striatum, qui expriment des niveaux élevés de guanylyl cyclase soluble

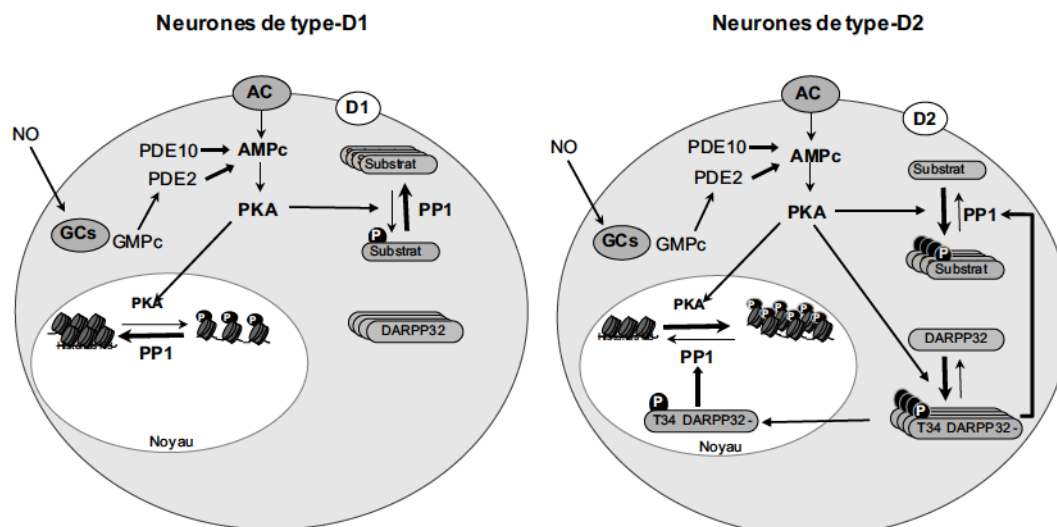


Fig. 3. Rôle des phosphodiésterases 2 et 10 (PDE2 et PDE10) dans les neurones épineux moyens de type D1 et de type D2 du striatum. L'inhibition de la PDE10A augmente l'AMPc et active la PKA à des niveaux similaires dans les deux types de neurones. Dans les neurones de type D2, la phosphorylation de la DARPP-32 inhibe la protéine phosphatase PP-1 : les substrats de la PKA restent donc dans l'état phosphorylé, à la fois dans le cytosol et dans le noyau. Dans les neurones de type D1, la DARPP-32 est dans un état déphosphorylé : PP-1 est pleinement active et déphosphoryle les substrats de la PKA. En parallèle, la PDE2 apparaît comme un effecteur important de la signalisation par l'oxyde d'azote (NO), en modulant indirectement le signal AMPc *via* le GMPc.

(Matsuoka *et al.*, 1992 ; Ding *et al.*, 2004), expriment également des niveaux très élevés de PDE2 (Repaske *et al.*, 1993 ; Wykes *et al.*, 2002 ; Van Staveren *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2010). Ceci suggère que le rôle majeur du GMPc, au lieu d'activer la PKG, pourrait être de réguler le niveau d'AMPc *via* l'activation de la PDE2. En effet, une caractéristique de la PDE2 est une activation allostérique de l'activité phosphodiésterase par le GMPc : en l'absence de GMPc, l'activité de la PDE2 vis à vis de l'AMPc est faible, mais en présence du GMPc son activité augmente fortement (Martins *et al.*, 1982 ; Martinez *et al.*, 2002). L'interaction entre les signaux AMPc et GMPc par PDE2 a été bien caractérisée dans le système cardio-vasculaire (Maurice, 2005 ; Nikolaev *et al.*, 2005), où la régulation de l'AMPc se produit dans un espace confiné et dépend de la source de GMPc (Castro *et al.*, 2006 ; Stangherlin *et al.*, 2011). La régulation des nucléotides cycliques par la PDE2 a été également démontrée dans les neurones du thalamus (Hepp *et al.*, 2007) et du striatum (Lin *et al.*, 2010). Plus précisément, l'imagerie de biosenseurs a montré que l'activation de la cascade NO/GMPc réduit fortement les signaux AMPc transitoires dans les neurones D1 et D2 du striatum (Polito *et al.*, 2013). Ceci est dû à une activation de la PDE2 par le GMPc (Figure 1). Cet effet inhibiteur du GMPc sur l'AMPc joue certainement un rôle fonctionnel important puisque son effet se propage en aval, au niveau de la réponse PKA induite par la dopamine.

Pathologies du système nerveux central

L'évolution de nombreuses maladies du SNC s'accompagne de remodelages de la signalisation AMPc/PKA. La connaissance des événements moléculaires qui contribuent à un dysfonctionnement moteur dans la maladie de Parkinson a progressé rapidement au cours de la dernière décennie. Des études sur des modèles animaux ainsi que chez les patients atteints par cette maladie montrent des adaptations puissantes de la neuromodulation dopaminergique lors de la maladie. D'abord, l'absence de stimulation liée à la perte des neurones dopaminergiques, puis la stimulation excessive durant le traitement à la L-DOPA, conduisent à des changements adaptatifs dans les neurones épineux moyens du striatum et à des modifications de la réponse fonctionnelle.

Dans le domaine de la psychiatrie, des études cliniques et pharmacologiques démontrent une baisse des niveaux d'expression des sous-unités régulatrices (RII beta) et catalytiques de la PKA chez les patients dépressifs mélancoliques, comparés à ceux des patients non mélancoliques et des sujets sains (Akin *et al.*, 2005), alors que dans les troubles bipolaires, les niveaux d'expression des sous-unités catalytiques et régulatrices (RII beta) de la PKA augmentent (Chang *et al.*, 2003). La PKA n'est pas le seul acteur de la signalisation AMPc qui se trouve affecté dans les troubles psychiatriques : plusieurs gènes

de la signalisation AMPc, dont notamment les gènes codant pour la PDE10A et la sous-unité alpha des protéines G stimulatrices, présentent des polymorphismes associés avec les troubles bipolaires ou la schizophrénie (Tam *et al.*, 2010; Kerner *et al.*, 2011; McDonald *et al.*, 2012; Talkowski *et al.*, 2012).

Il est difficilement envisageable de fonder une stratégie thérapeutique sur une pharmacologie ciblant la PKA, car celle-ci est ubiquitaire et présente peu de variations susceptibles de créer des inhibiteurs sélectifs. En revanche, la grande diversité d'isoformes des phosphodiesterases, ainsi que leur expression restreinte à des régions du cerveau, voire même des types neuronaux spécifiques, laisse envisager la possibilité d'une action ciblée avec des effets indésirables périphériques réduits. Ainsi, après la création du sildenafil (inhibiteur de PDE5 plus connu sous le nom de Viagra), les entreprises pharmaceutiques se sont lancées dans des projets ciblant la plupart des phosphodiesterases avec comme ambition de traiter des pathologies neurologiques ou psychiatriques. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de la PDE4 est évaluée depuis longtemps comme traitement pro-cognitif ou antidépresseur (O'Donnell & Zhang, 2004; Renau, 2004), avec des effets cliniques intéressants mais trop d'effets indésirables. La PDE10 quant à elle semble être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la schizophrénie, du fait d'une expression restreinte au striatum et des résultats précliniques encourageants (Kehler *et al.*, 2007; Menniti *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2008; Chappie *et al.*, 2009; Kehler & Nielsen, 2011). Pourtant, les essais cliniques furent décevants. *A posteriori*, des études fondamentales révélaient un mécanisme d'action de ces drogues qui était totalement inattendu (Polito *et al.*, 2015), soulignant l'importance d'une meilleure compréhension mécanistique au niveau cellulaire avant de tenter d'extrapoler l'effet d'une drogue à un comportement animal, voire un effet clinique en psychiatrie.

Divers projets continuent actuellement, qui ciblent la PDE1, une phosphodiesterase particulièrement intéressante puisqu'elle intègre le signal calcique en une activité phosphodiesterase double, ciblant AMPc et GMPc : son inhibition pourrait traiter des pertes cognitives (Deal watch, 2011; Heckman *et al.*, 2015). Là encore, le rôle fonctionnel de cette PDE dans la régulation de l'AMPc et du GMPc est très mal connu à l'échelle cellulaire, et les approches dynamiques basées sur l'imagerie de biosenseurs devraient éclairer ce nouveau champ d'investigation.

Conclusions

Au cours de la dernière décennie, l'incroyable puissance de la génétique a permis de démontrer l'implica-

tion d'un certain nombre de gènes dans une multitude de maladies neuropsychiatriques, tandis que la chimie médicinale a créé des médicaments très spécifiques pour un certain nombre d'enzymes de signalisation. Cependant, la fonction précise de ces enzymes de signalisation reste mystérieuse. L'imagerie de biosenseurs, en fournissant une image dynamique des processus de signalisation, aidera à mieux comprendre les principes fondamentaux des processus d'intégration qui se déroulent dans un tissu ou dans des neurones individuels. Ce type d'approche peut contribuer à la compréhension du mécanisme d'action d'un certain nombre de médicaments au niveau pré-clinique. Alors que l'imagerie *in vivo* de l'AMPc / PKA n'a été appliquée qu'à la drosophile jusqu'à présent (Tomchik & Davis, 2009; Gervasi *et al.*, 2010), l'imagerie du calcium dans le cerveau de rongeurs vivants est couramment effectuée sans obstacle technologique. L'analyse en temps réel du processus AMPc/PKA dans le cerveau d'un animal vivant permettrait d'ouvrir des perspectives considérables pour la recherche fondamentale et pré-clinique.

Références

- Akin D., Manier D.H., Sanders-Bush, E, Shelton R.C. (2005). Signal transduction abnormalities in melancholic depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, 5–16.
- Allen M.D., Zhang J. (2006) Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 716–721.
- Ariano M.A., Lewicki J.A., Brandwein H.J., Murad F. (1982) Immunohistochemical localization of guanylate cyclase within neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 1316–1320.
- Bateup H.S., Svenningsson P., Kuroiwa M., Gong S., Nishi A., Heintz N., Greengard P. (2008) Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nat Neurosci*, 11, 932–939.
- Bertran-Gonzalez J., Bosch C., Maroteaux M., Matamalas M., Hervé D., Valjent E., Girault J.A. (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*, 28, 5671–5685.
- Bockaert J., Perroy J., Becamel C., Marin P., Fagni L. (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system : Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 89–109.
- Calabresi P., Gubellini P., Centonze D., Sancesario G., Morello M., Giorgi, M, Pisani A., Bernardi G. (1999) A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J Neurosci*, 19, 2489–2499.
- Calabresi P., Centonze D., Gubellini P., Marfia G.A., Pisani A., Sancesario, G, Bernardi G. (2000). Synaptic transmission in the striatum : from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 61, 231–265.

- Calebiro D., Nikolaev V.O., Gagliani M.C., de Filippis T., Dees C., Tacchetti C., Persani L., Lohse M.J. (2009) Persistent cAMP-Signals Triggered by Internalized G-Protein-Coupled Receptors. *PLoS Biol*, 7, e1000172.
- Carlson H.J., Campbell R.E. (2009) Genetically encoded FRET-based biosensors for multiparameter fluorescence imaging. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 19–27.
- Castro L.R., Verde I., Cooper D.M., Fischmeister R. (2006) Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 113, 2221–2228.
- Castro L.R., Gervasi N., Guiot E., Cavellini L., Nikolaev V.O., Paupardin-Tritsch D., Vincent P. (2010) Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci*, 30, 6143–6151.
- Castro L.R., Brito M., Guiot E., Polito M., Korn C.W., Hervé D., Girault J.A., Paupardin-Tritsch D., Vincent P. (2013) Striatal neurones have a specific ability to respond to phasic dopamine release. *J Physiol*, 591, 3197–3214.
- Chang A., Li P.P., Warsh J.J. (2003) Altered cAMP-dependent protein kinase subunit immunolabeling in post-mortem brain from patients with bipolar affective disorder. *J Neurochem*, 84, 781–791.
- Chappie T., Humphrey J., Menniti F., Schmidt C. (2009) PDE10A inhibitors : an assessment of the current CNS drug discovery landscape. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 12, 458–467.
- Coskran T.M., Morton D., Menniti F.S., Adamowicz W.O., Kleiman R.J., Ryan A.M., Strick C.A., Schmidt C.J., Stephenson D.T. (2006) Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, 54, 1205–1213.
- Craven K.B., Zagotta W.N. (2006) CNG and HCN channels : two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*, 68, 375–401.
- De Vente J., Asan E., Gambaryan S., Markerink-van Ittersum M., Axer H., Gallatz K., Lohmann S.M., Palkovits M. (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*, 108, 27–49.
- Deal watch : Intra-Cellular Therapies and Takeda to develop PDE1 inhibitors for schizophrenia. (2011). *Nat Rev Drug Discov*, 10, 329.
- Depry C., Allen M.D., Zhang J. (2011) Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst*, 7, 52–58.
- Ding J.D., Burette A., Nedvetsky P.I., Schmidt H.H., Weinberg R.J. (2004) Distribution of soluble guanylyl cyclase in the rat brain. *J Comp Neurol*, 472, 437–448.
- Dulla C., Tani H., Okumoto S., Frommer W.B., Reimer R.J., Huguenard J.R. (2008) Imaging of glutamate in brain slices using FRET sensors. *J Neurosci Methods*, 168, 306–319.
- Dunn T.A., Feller M.B. (2008) Imaging second messenger dynamics in developing neural circuits. *Dev Neurobiol*, 68, 835–844.
- Dunn T.A., Wang C.T., Colicos M.A., Zaccolo M., DiPilato L.M., Zhang J., Tsien, R.Y., Feller M.B. (2006) Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. *J Neurosci*, 26, 12807–12815.
- Dunn T.A., Storm D.R., Feller M.B. (2009) Calcium-dependent increases in protein kinase-A activity in mouse retinal ganglion cells are mediated by multiple adenylate cyclases. *PLoS One*, 4, e7877.
- Duvall L.B., Taghert P.H. (2012) The circadian neuropeptide PDF signals preferentially through a specific adenylate cyclase isoform AC3 in *M. pacemakers* of *Drosophila*. *PLoS Biol*, 10, e1001337.
- El-Husseini A.E., Bladen C., Vincent S.R. (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*, 64, 2814–2817.
- El-Husseini A.E., Williams J., Reiner P.B., Pelech S., Vincent S.R. (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat*, 17, 45–55.
- Erard M., Fredj A., Pasquier H., Beltongar D.B., Bousmah Y., Derrien V., Vincent P., Merola F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Mol Biosyst*, 9, 258–267.
- Friedrich M.W., Aramuni G., Mank M., Mackinnon J.A., Griesbeck O. (2010) Imaging CREB activation in living cells. *J Biol Chem*, 285, 23285–23295.
- Garthwaite J. (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, 27, 2783–2802.
- Gervasi N., Hepp R., Tricoire L., Zhang J., Lambolez B., Paupardin-Tritsch D., Vincent P. (2007) Dynamics of protein kinase A signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J Neurosci*, 27, 2744–2750.
- Gervasi N., Tchenio P., Preat T. (2010) PKA dynamics in a *Drosophila* learning center : coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron*, 65, 516–529.
- Gloerich M., Bos J.L. (2010) Epac : defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 355–375.
- Gorbunova Y.V., Spitzer N.C. (2002) Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca^{2+} spikes. *Nature*, 418, 93–96.
- Harbeck M.C., Chepurny O., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Holz G.G., Roe M.W. (2006) Simultaneous optical measurements of cytosolic Ca^{2+} and cAMP in single cells. *Sci STKE*, 2006, pl6.
- Heckman P.R., Wouters C., Prickaerts J. (2015) Phosphodiesterase inhibitors as a target for cognition enhancement in aging and Alzheimer's disease : a translational overview. *Curr Pharm Des*, 21, 317–331.
- Heiman M., Schaefer A., Gong S., Peterson J.D., Day M., Ramsey K.E., Suarez-Farinas M., Schwarz C., Stephan D.A., Surmeier D.J., Greengard P., Heintz N. (2008) A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell*, 135, 738–748.

- Hepp R., Tricoire L., Hu E., Gervasi N., Paupardin-Tritsch D., Lambolez B., Vincent P. (2007) Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J Neurochem*, 102, 1875–1886.
- Hervé D., Girault, J.-A. (2005) Signal transduction of dopamine receptors. In : *Dopamine*, Dunnett S.B., Bentivoglio M., Björklund A. (Eds.), Elsevier, Vol. 21, pp. 109–151.
- Hires S.A., Zhu Y., Tsien R.Y. (2008) Optical measurement of synaptic glutamate spillover and reuptake by linker optimized glutamate-sensitive fluorescent reporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 4411–4416.
- Hu E., Demmou L., Cauli B., Gallopin T., Geoffroy H., Harris-Warrick R.M., Paupardin-Tritsch D., Lambolez B., Vincent P., Hepp R. (2011) VIP C.R.F. and PACAP Act at Distinct Receptors to Elicit Different cAMP/PKA Dynamics in the Neocortex. *Cereb Cortex*, 21, 708–718.
- Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. (2003) FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21, 1387–1395.
- Kaupp U.B., Seifert R. (2001) Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels. *Annu Rev Physiol*, 63, 235–257.
- Kawaguchi Y. (1997) Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res*, 27, 1–8.
- Kehler J., Nielsen J. (2011) PDE10A inhibitors : novel therapeutic drugs for schizophrenia. *Curr Pharm Des*, 17, 137–150.
- Kehler J., Ritzén A., Greve D.R.PQ (2007) The potential therapeutic use of phosphodiesterase 10 inhibitors. *Expert Opin Ther Patents*, 17, 147–158.
- Kelly M.P., Adamowicz W., Bove S., Hartman A.J., Mariga A., Pathak G., Reinhart V., Romegialli A., Kleiman R.J. (2014) Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal*, 26, 383–397.
- Kerner B., Lambert C.G., Muthén B.O. (2011) Genome-wide association study in bipolar patients stratified by co-morbidity. *PLoS One*, 6, e28477.
- Klarenbeek J.B., Goedhart J., Hink M.A., Gadella T.W., Jalink K. (2011) A mTurquoise-Based cAMP Sensor for Both FLIM and Ratiometric Read-Out Has Improved Dynamic Range. *PLoS One*, 6, e19170.
- Knopfel T. (2012) Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 13, 687–700.
- Lakics V., Karran E.H., Boess F.G. (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, 59, 367–374.
- Lalonde S., Ehrhardt D.W., Frommer W.B. (2005) Shining light on signaling and metabolic networks by genetically encoded biosensors. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 574–581.
- Landa L.R.J., Harbeck M., Kaihara K., Chepurny O., Kitiphongpattana K., Graf O, Nikolaev V.O., Lohse M.J., Holz G.G., Roe M.W. (2005) Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem*, 280, 31294–31302.
- Leroy J., Abi-Gerges A., Nikolaev V.O., Richter W., Lechène P., Mazet J.L., Conti M., Fischmeister R., Vandecasteele G. (2008) Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes : role of phosphodiesterases. *Circ Res*, 102, 1091–1100.
- Li L., Gervasi N., Girault J.A. (2015) Dendritic geometry shapes neuronal cAMP signalling to the nucleus. *Nat Commun*, 6, 6319.
- Lin D.T., Fretier P., Jiang C., Vincent S.R. (2010) Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. *Synapse*, 64, 460–466.
- Looger L.L., Griesbeck O. (2012) Genetically encoded neural activity indicators. *Curr Opin Neurobiol*, 22, 18–23.
- Martinez S.E., Wu A.Y., Glavas N.A., Tang X.B., Turley S., Hol W.G., Beavo J.A. (2002) The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13260–13265.
- Martins T.J., Mumby M.C., Beavo J.A. (1982) Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem*, 257, 1973–1979.
- Marvin J.S., Borghuis B.G., Tian L., Cichon J., Harnett M.T., Akerboom J., Gordus A., Renninger S.L., Chen T.W., Bargmann C.I., Orger M.B., Schreiter E.R., Demb J.B., Gan W.B., Hires S.A., Looger L.L. (2013) An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat Methods*, 10, 162–170.
- Matsuoka I., Giulli G., Poyard M., Stengel D., Parma J., Guellaen G., Hanoune J. (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization : comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci*, 12, 3350–3360.
- Maurice D.H. (2005) Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci*, 10, 1221–1228.
- McDonald M.L., MacMullen C., Liu D.J., Leal S.M., Davis R.L. (2012) Genetic association of cyclic AMP signaling genes with bipolar disorder. *Transl Psychiatry*, 2, e169.
- Menniti F.S., Chappie T.A., Humphrey J.M., Schmidt C.J. (2007) Phosphodiesterase 10A inhibitors : a novel approach to the treatment of the symptoms of schizophrenia. *Curr Opin Investig Drugs*, 8, 54–59.
- Mironov S.L., Skorova E., Taschenberger G., Hartelt N., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Kugler S. (2009) Imaging cytoplasmic cAMP in mouse brainstem neurons. *BMC Neurosci*, 10, 29.
- Miyawaki A. (2003) Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell*, 4, 295–305.
- Morris M.C. (2010) Fluorescent biosensors of intracellular targets from genetically encoded reporters to modular polypeptide probes. *Cell Biochem Biophys*, 56, 19–37.

- Neves S.R., Tsokas P., Sarkar A., Grace E.A., Rangamani P., Taubenfeld S.M., Alberini C.M., Schaff J.C., Blitz R.D., Moraru I.I., Iyengar R. (2008) Cell shape and negative links in regulatory motifs together control spatial information flow in signaling networks. *Cell*, 133, 666–680.
- Nicol X., Hong K.P., Spitzer N.C. (2011) Spatial and temporal second messenger codes for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 13776–13781.
- Nikolaev V.O., Bunemann M., Hein L., Hannawacker A., Lohse M.J. (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem*, 279, 37215–37218.
- Nikolaev V.O., Gambaryan S., Engelhardt S., Walter U., Lohse M.J. (2005) Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells : hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *J Biol Chem*, 280, 1716–1719.
- Nomura S., Bouhadana M., Morel C., Faure P., Cauli B., Lambolez B., Hepp, R (2014) Noradrenalin and dopamine receptors both control cAMP-PKA signaling throughout the cerebral cortex. *Front Cell Neurosci*, 8, 247.
- O'Donnell J.M., Zhang H.T. (2004) Antidepressant effects of inhibitors of cAMP phosphodiesterase (PDE4). *Trends Pharmacol Sci*, 25, 158–163.
- Okumoto S., Looger L.L., Micheva K.D., Reimer R.J., Smith S.J., Frommer W.B. (2005) Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 8740–8745.
- Polito M., Klarenbeek J., Jalink K., Paupardin-Tritsch D., Vincent P., Castro L.R. (2013) The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci*, 7, 211.
- Polito M., Guiot E., Gangarossa G., Longueville S., Doulazmi M., Valjent E., Hervé D., Girault J.A., Paupardin-Tritsch D., Castro L.R., Vincent, P (2015) Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro*, 2, 1–15.
- Renau T.E. (2004) The potential of phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of depression : opportunities and challenges. *Curr Opin Investig Drugs*, 5, 34–39.
- Repaske D.R., Corbin J.G., Conti M., Goy M.F. (1993) A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*, 56, 673–686.
- Rich T.C., Fagan K.A., Tse T.E., Schaack J., Cooper D.M., Karpen J.W. (2001a) A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 13049–13054.
- Rich T.C., Tse T.E., Rohan J.G., Schaack J., Karpen J.W. (2001b) In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as cAMP sensors. *J Gen Physiol*, 118, 63–78.
- Rushlow W., Flumerfelt B.A., Naus C.C. (1995) Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH-diaphorase in the caudate-putamen of the rat. *J Comp Neurol*, 351, 499–508.
- Schmidt C.J., Chapin D.S., Cianfroga J., Corman M.L., Hajos M., Harms J.F., Hoffman W.E., Lebel L.A., McCarthy S.A., Nelson F.R., Proulx-LaFrance C., Majchrzak M.J., Ramirez A.D., Schmidt K., Seymour P.A., Siuciak J.A., Tingley, FD, Williams R.D., Verhoest P.R., Menniti F.S. (2008) Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors : a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 681–690.
- Scott J.D., Dessauer C.W., Tasken K. (2013) Creating order from chaos : cellular regulation by kinase anchoring. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 187–210.
- Seeger T.F., Bartlett B., Coskran T.M., Culp J.S., James L.C., Krull D.L., Lanfear J., Ryan A.M., Schmidt C.J., Strick C.A., Varghese A.H., Williams R.D., Wylie P.G., Menniti F.S. (2003) Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res*, 985, 113–126.
- Shafer O.T., Kim D.J., Dunbar-Yaffe R., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Taghert P.H. (2008) Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron*, 58, 223–237.
- Shelly M., Lim B.K., Cancedda L., Heilshorn S.C., Gao H., Poo M.M. (2010) Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science*, 327, 547–552.
- Sipietier F., Vandame P., Spriet C., Leray A., Vincent P., Trinel D., Bodart, JF, Riquet F.B., Heliot, L. (2013) From FRET imaging to practical methodology for kinase activity sensing in living cells. In : *Fluorescence-Based Biosensors — From Concepts to Applications*, Morris M. (Ed.), Academic Press, Elsevier, Vol. 113, pp. 145–216.
- Stangherlin A., Gesellchen F., Zoccarato A., Terrin A., Fields L.A., Berrera, M, Surdo N.C., Craig M.A., Smith G., Hamilton G., Zaccolo M. (2011) cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res*, 108, 929–939.
- Talkowski M.E., Rosenfeld J.A., Blumenthal I., Pillalamarri V., Chiang C., Heilbut A., Ernst C., Hanscom C., Rossin E., Lindgren A.M., Pereira S., Ruderfer D., Kirby A., Ripke S., Harris D.J., Lee J.H., Ha K., Kim H.G., Solomon B.D., Gropman A.L., Lucente D., Sims K., Ohsumi T.K., Borowsky M.L., Loranger S., Quade B., Lage K., Miles J., Wu B.L., Shen Y., Neale B., Shaffer L.G., Daly M.J., Morton C.C., Gusella J.F. (2012) Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell*, 149, 525–537.

- Tam G.W., van de Lagemaat L.N., Redon R., Strathdee K.E., Croning M.D., Malloy MP, Muir W.J., Pickard B.S., Deary I.J., Blackwood D.H., Carter N.P., Grant S.G. (2010) Confirmed rare copy number variants implicate novel genes in schizophrenia. *Biochem Soc Trans*, 38, 445–451.
- Tasken K., Aandahl E.M. (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 84, 137–167.
- Taylor S.S., Buechler J.A., Yonemoto W. (1990) cAMP-dependent protein kinase : framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59, 971–1005.
- Taylor S.S., Ilouz R., Zhang P., Kornev A.P. (2012) Assembly of allosteric macromolecular switches : lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 646–658.
- Tomchik S.M., Davis R.L. (2009) Dynamics of learning-related cAMP signaling and stimulus integration in the *Drosophila* olfactory pathway. *Neuron*, 64, 510–521.
- Van Staveren W.C., Steinbusch H.W., Markerink-Van Ittersum M., Repaske D.R., Goy M.F., Kotera J., Omori K., Beavo J.A., De Vente J. (2003) mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol*, 467, 566–580.
- Van Engelenburg S.B., Palmer A.E. (2008) Fluorescent biosensors of protein function. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 60–65.
- Vincent S.R. (2000) Histochemistry of nitric oxide synthase in the central nervous system. In : *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*, Steinbusch H.W.M., De Vente J., Vincent S.R. (Eds.), Elsevier, Vol. 17, pp. 19–49.
- Vincent S.R., Kimura H. (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46, 755–784.
- Violin J.D., Dipilato L.M., Yildirim N., Elston T.C., Zhang J., Lefkowitz R.J. (2008) β 2-Adrenergic Receptor Signaling and Desensitization Elucidated by Quantitative Modeling of Real Time cAMP Dynamics. *J Biol Chem*, 283, 2949–2961.
- Wachten S., Masada N., Ayling L.J., Ciruela A., Nikolaev V.O., Lohse M.J., Cooper D.M. (2010) Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci*, 123, 95–106.
- West A.R., Galloway M.P., Grace A.A. (2002) Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide : effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227–245.
- West A.R., Grace A.A. (2004) The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci*, 24, 1924–1935.
- West A.R., Tseng K.Y. (2011) Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum : New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Front Syst Neurosci*, 5, 55.
- Willoughby D., Cooper D.M. (2006) Ca^{2+} stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. *J Cell Sci*, 119, 828–836.
- Wouters F.S., Verveer P.J., Bastiaens P.I. (2001) Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol*, 11, 203–11.
- Wykes V., Bellamy T.C., Garthwaite J. (2002) Kinetics of nitric oxide-cyclic GMP signalling in CNS cells and its possible regulation by cyclic GMP. *J Neurochem*, 83, 37–47.
- Zhang J., Ma Y., Taylor S.S., Tsien R.Y. (2001) Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 14997–15002.
- Zhang J., Campbell R.E., Ting A.Y., Tsien R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 906–918.
- Zhang J., Hupfeld C.J., Taylor S.S., Olefsky J.M., Tsien R.Y. (2005) Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. *Nature*, 437, 569–573.